

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA

GUILHERME DA CRUZ SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOEMULSÕES À BASE
DE COMPOSTOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE ESPÉCIES DE
Xanthomonas CAUSADORAS DO CANCRO CÍTRICO**

SÃO CARLOS - SP

2020

GUILHERME DA CRUZ SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOEMULSÕES À BASE
DE COMPOSTOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE ESPÉCIES DE
Xanthomonas CAUSADORAS DO CANCRO CÍTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Marcos David
Ferreira e Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de
Souza.

SÃO CARLOS - SP

2020

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos, por serem a base do meu apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Dr. Marcos David Ferreira, e co-orientador, Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, por todos ensinamentos, sugestões e pontuações.

À Joana Dias Bresolin, Josemar Oliveira e Marcela Miranda, pelas contribuições, ajuda e parceria.

Aos membros e equipe do Laboratório de Tecnologias Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças da Embrapa Instrumentação, pelo apoio, conversas e amizade.

À prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, por gentilmente ceder as cepas bacterianas utilizadas nesse estudo.

RESUMO

O cancro cítrico é uma das doenças de maior relevância que acometem a citricultura, sendo responsável por sérios prejuízos econômicos aos produtores e comerciantes de frutas cítricas. Essa doença é causada por bactérias Gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, podendo levar à queda prematura dos frutos e perda total das plantas presentes na área infectada. Hoje em dia, o controle do cancro cítrico é realizado através de métodos em campo de prevenção da proliferação do agente etiológico da doença aliado ao uso de compostos à base de cobre que inibem o desenvolvimento da bactéria. No entanto, é de interesse geral a procura por alternativas mais sustentáveis e que sejam de fato efetivas na erradicação da doença. Nesse trabalho, foram investigados os potenciais de ação antimicrobiana de eugenol, timol, geraniol e mentona (compostos majoritários de óleos essenciais) e do óleo essencial (OE) de gengibre contra duas cepas de *Xanthomonas* causadoras do cancro cítrico (Xac e Xau-B). Para potencializar seu espectro de ação, foram produzidas nanoemulsões para cada composto e óleo, as quais passaram por análises da suspensão para caracterização dos tamanhos das partículas e estabilidade. As nanoemulsões de timol e OE de gengibre apresentaram os menores tamanhos de partículas e mais elevadas estabilidades. Porém, dessas duas, somente a nanoemulsão de timol demonstrou capacidade de inibir o desenvolvimento das ambas cepas de bactérias, com concentrações mínimas inibitórias (MIC) de 0.03 % (v/v), juntamente das nanoemulsões de eugenol (com MIC de 0.03 % (v/v) para Xac e 0.02 % (v/v) para Xau-B) e de geraniol (com MIC de 0.06 % (v/v) para ambas as bactérias). O timol foi o composto com mais concentrações mínimas bactericidas (MBC), com valores de 0.03 % (v/v) para ambas as cepas bacterianas. O eugenol apresentou MBC apenas contra Xau-B, na concentração de 0.03 % (v/v). O geraniol não demonstrou atividade bactericida, o que sugere uma ação bacteriostática desse composto com os microrganismos testados. De modo geral, Xac foi mais suscetível às atividades bacteriostáticas, enquanto que Xau-B foi mais sensível às ações bactericidas. As nanoemulsões de óleo de gengibre e de mentona não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: cancro cítrico, *Xanthomonas*, óleos essenciais, nanoemulsões.

ABSTRACT

Citrus canker is one of the most relevant diseases that affect citrus crops, being responsible for serious economic losses to citrus fruit producers and traders. This disease is caused by Gram-negative bacteria of the genus *Xanthomonas*, which can lead to premature fruit fall and total loss of plants present in the infected area. Nowadays, the control of citrus canker is carried out through methods in the field of prevention of the proliferation of the etiological agent of the disease combined with the use of copper-based compounds that inhibit the development of the bacterium. However, the search for more sustainable alternatives that are in fact effective in eradicating the disease is of general interest. In this work, the potentials of antimicrobial action of eugenol, thymol, geraniol and menthone (major compounds of essential oils) and essential oil (EO) of ginger against two strains of *Xanthomonas* that cause citrus canker (Xac and Xau-B) were investigated. In order to enhance its action spectrum, nanoemulsions were produced for each compound and oil, which underwent suspension analysis to characterize particle sizes and stability. The thymol and ginger EO nanoemulsions had the smallest particle sizes and the highest stability. However, of these two, only the thymol nanoemulsion showed the ability to inhibit the development of both strains of bacteria, with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 0.03% (v/v), along with eugenol nanoemulsions (with MIC of 0.03% (v/v) for Xac and 0.02% (v/v) for Xau-B) and geraniol (with MIC of 0.06% (v/v) for both bacteria). Thymol was the compound with the highest minimum bactericidal concentrations (MBC), with values of 0.03% (v/v) for both bacterial strains. Eugenol showed MBC only against Xau-B, at a concentration of 0.03% (v/v). Geraniol did not show bactericidal activity, which suggests a bacteriostatic action of this compound with the tested microorganisms. In general, Xac was more susceptible to bacteriostatic activities, while Xau-B was more sensitive to bactericidal actions. The ginger EO and menthone nanoemulsions did not show any antimicrobial activity.

Key words: citrus canker, *Xanthomonas*, essential oils, nanoemulsions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Lesões de cancro cítrico em frutos, ramos e folhas. Fonte: https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro	13
Figura 2. Teste sorológico para detecção de cancro cítrico. A banda controle indica que o teste foi realizado corretamente, e a segunda banda informa a presença da bactéria causadora do cancro cítrico. As duas bandas devem ser reveladas para que o teste seja considerado positivo. Fonte: Fundecitrus, 2017.	16
Figura 3. Fragmento da rota da síntese de terpenos, com as diferenças nas estruturas de mono, sesqui e diterpenos. Fonte: Martins, 2012.	19
Figura 4. Esquematização da diluição seriada no ensaio de concentração mínima inibitória (MIC).	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de abreviações para as nanoemulsões preparadas de cada componente. . 31
- Tabela 2.** Resultados das caracterizações das emulsões de eugenol (NEE), geraniol (NEG), timol (NET), mentona (NEM) e óleo essencial de gengibre (NEOG). Os tamanhos (z-average, em nm) e os índices de polidispersão (PDI) das partículas são mostrados para cada rotação de emulsificação utilizada. As leituras foram feitas 0 e 24 horas após o preparo das amostras. 35
- Tabela 3.** Resultados para o ensaio de avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xau-B). As concentrações de eugenol (NEE), geraniol (NEG), timol (NET), mentona (NEM) e óleo essencial de gengibre (NEOG) presentes em sua respectiva nanoemulsão são descritas em percentual (v/v), nas três rotações para emulsificação utilizadas (7.000, 12.000 e 16.000 rpm). 38
- Tabela 4.** Resultados para o ensaio de avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xau-B). As concentrações de eugenol (NEE), geraniol (NEG) e timol (NET) presentes em sua respectiva nanoemulsão são descritas em percentual (v/v), nas três rotações para emulsificação utilizadas (7.000, 12.000 e 16.000 rpm)..... 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 CITRICULTURA NO MUNDO E NO BRASIL.....	10
2.2 O CANCRO CÍTRICO	11
2.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DO CANCRO CÍTRICO.....	14
2.4 MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO E CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO ...	15
2.5 COMPOSTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	18
2.5.1 Eugenol.....	20
2.5.2 Timol.....	21
2.5.3 Geraniol	22
2.5.4 Mentona.....	23
2.5.5 Óleo essencial de gengibre	24
2.6 NANOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS NATURAIS.....	29
3.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	29
3.3 PRODUÇÃO DOS INÓCULOS.....	29
3.4 PRODUÇÃO DAS NANOEMULSÕES DOS PRODUTOS NATURAIS.....	30
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE	31
3.6 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA	31
3.7 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE	34
4.2 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA	38
4.3 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA	41
5 CONCLUSÃO	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é um dos mais importantes setores do agronegócio brasileiro e mundial. No Brasil, em especial, esse vem sendo um braço decisivo da economia e uma importante máquina de geração de empregos (NEVES & TROMBIN, 2017). Este fenômeno acontece porque, além de seu consumo *in natura*, as frutas cítricas são também consumidas por meio de seus processados, tais como sucos e doces (PASSOS *et al.*, 2016). Segundo a Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos, o suco de laranja brasileiro é um dos mais importantes produtos de exportação agrícola do país, em especial para países da União Europeia e regiões da América do Norte (CitrusBR, 2019). Além disso, algumas variedades de limão são a base da produção de cítricos de países como México e Argentina (USDA, 2020).

Na última década, quatro doenças principais foram responsáveis por causar inúmeras perdas à indústria da citricultura: *citrus variegated chlorosis* (CVC), *huanglongbing* ou *greening* (HLB), *citrus sudden death* (MSC) e o cancro cítrico. Destas, três são comprovadamente causadas por microrganismos fitopatogênicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; NEVES; TROMBIN; KALAKI, 2014; FADEL *et al.*, 2018; JUNIOR *et al.*, 2009; POOLER & HARTUNG, 1995).

O cancro cítrico, em particular, é uma doença de impacto na indústria global de citricultura, podendo ocasionar o desfolhamento e queda prematura dos frutos infectados (BRUNINGS e GABRIEL, 2003). É causado por espécies de bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas* (SWINGS; VAUTERIN; KERSTERS, 1993), as quais podem acarretar três principais tipos da doença: o Cancro A, provocado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; o Cancro B, causado pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B; e o Cancro C, provocado pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C. As espécies hospedeiras podem diferir para cada tipo, mas os sintomas apresentados pelos frutos infectados são, em linhas gerais, parecidos (MOREIRA *et al.*, 2010; BRUNINGS & GABRIEL, 2003).

Ainda não existem métodos curativos para o tratamento do cancro cítrico. (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997). A prevenção para locais aonde não se tem registro da doença é realizada através da erradicação de plantas infectadas (SCHUBERT & SUN, 1996). Onde o cancro é endêmico, compostos antimicrobianos à base de cobre são pulverizados para controle da doença (LAMICHHANE *et al.*, 2018). No entanto, além de não ser uma medida totalmente

eficiente, a utilização de agroquímicos cúpricos pode causar danos à saúde humana e ao meio ambiente a longo prazo (DAUNGFU; YOUNPENSUK; LAMYONG, 2019). Há, ainda, registros de cepas de *Xanthomonas spp.* resistentes a antibacterianos a base de cobre (RICHARD *et al.*, 2017).

Para que tais riscos sejam evitados ou minimizados, a utilização de técnicas que usufruam de alternativas naturais e biodegradáveis vem sendo muito estudada nos últimos anos. Um exemplo disso são revestimentos obtidos de fontes vegetais, combinando propriedades físico-químicas e antimicrobianas para aplicação na agricultura (DU PLOOY; REGNIER; COMBRINCK; 2009).

Os óleos essenciais e outros extratos vegetais podem fornecer atividade antimicrobiana a esses revestimentos, devido aos seus vastos compostos bioativos (PERDONES, 2012; MABONA, 2013). O óleo essencial de gengibre; o eugenol, composto majoritário do óleo de cravo; o timol, abundante no óleo de tomilho; o geraniol, componente do óleo essencial de citronela, e a mentona, encontrada no óleo de hortelã-pimenta, são produtos naturais reconhecidamente detentores de propriedades antimicrobianas (YAMAMOTO-RIBEIRO *et al.*, 2013; POZZO *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 1995). Para serem aplicados em frutas, no entanto, é preciso que se criem emulsões a partir de óleos essenciais ou de seus componentes, de modo a se garantir sua função (DONSI *et al.*, 2011).

A nanotecnologia, ciência que se refere ao estudo e manipulação de materiais em escala nanométrica, constitui-se como uma possível aliada para a potencialização dos efeitos antimicrobianos de produtos naturais (RAI e INGLE, 2012; DONSI *et al.*, 2011). Ao serem “nanoemulsificados”, as características físico-químicas desses compostos são mais preservadas e sua dispersão através de membranas biológicas é maior (DONSI & FERRARI, 2016).

Desta forma, visando satisfazer as exigências cada dia maiores por parte dos consumidores, e contribuir para que a agricultura impacte de forma menos negativa no meio ambiente, é preciso que alternativas à utilização excessiva de agroquímicos sejam encontradas. Portanto, o presente estudo visou, a associação de propriedades antimicrobianas de eugenol, geraniol, timol, mentona e óleo essencial de gengibre com a nanotecnologia para o aumento da atividade antibacteriana desses produtos naturais e sua possível aplicação no controle do cancro cítrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CITRICULTURA NO MUNDO E NO BRASIL

As frutas cítricas compreendem as espécies vegetais pertencentes à família *Rutaceae* e ao gênero *Citrus*, no qual estão inclusas variedades de laranjas, limões, tangerinas e toranjas (MOORE, 2001). Devido à alta capacidade de cruzamento entre espécies desse gênero, existe hoje em dia uma enorme variedade de citros disponíveis comercialmente, o que gera confusão e desentendimento entre os taxonomistas (MOORE, 2001; BERK, 2016).

Há uma discordância no que se refere à origem da citricultura. Acredita-se, de modo geral, que as frutas cítricas tenham surgido nas áreas tropicais e subtropicais do continente asiático, como a laranja doce e o limão, por exemplo, que teoricamente são de origem chinesa. No entanto, alguns estudiosos afirmam que a laranja possa ter surgido na Índia, e que a toranja provavelmente possui origens fora da Ásia (DUGO & DI GIACOMO, 2002; BATCHELOR & SINCLAIR, 1961; BERK, 2016). Há um consenso, porém, de que a citricultura se espalhou mundialmente a partir do continente asiático, através de fenômenos de imigração, guerra e exportação (BERK, 2016).

A dispersão mundial dos citros obedeceu a fatores climáticos favoráveis à sua cultura, instalando-se principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a chegada das frutas cítricas ocorre junto ao processo de colonização portuguesa em meados do século XVI, expandindo-se principalmente no sudeste brasileiro e liderando a produção mundial de laranjas desde a década de 1980 (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; NEVES *et al.*, 2010).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas mundial, atrás somente da China e da Índia (CARVALHO *et al.*, 2019). Nesse cenário, a produção relativa à citricultura se encontra em destaque. Segundo o Anuário Brasileiro de Horti & Fruti 2019, a laranja figura como a principal fruta produzida no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 34% da produção mundial. Ainda, de acordo com o anuário CitrusBR 2017, 57% do suco de laranja consumido mundialmente é de origem brasileira, sendo que o país exporta 97% de todo o suco produzido internamente.

Mais de 80% de toda a laranja produzida nacionalmente são cultivadas em regiões de São Paulo e do Triângulo Mineiro, no chamado "Cinturão citrícola

brasileiro" (NEVES *et al.*, 2010). Segundo dados recentes divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), é esperado que ocorra uma queda na produção de laranja no Brasil na safra de 2020, estimada em aproximadamente 3% comparado a dados anteriores. Isso ocorrerá principalmente devido ao fenômeno de safra alternada fora de época no cinturão citrícola de São Paulo, bem como à problemas climáticos relacionados com temperaturas mais quentes e baixos índices de precipitação. Mesmo com essa queda, espera-se que o Brasil lidere a produção mundial de laranja (USDA, 2020).

Além da laranja, uma fruta cítrica muito consumida mundialmente é o limão. No Brasil, a região do cinturão citrícola, correspondente ao estado de São Paulo e ao Triângulo/Sudoeste Mineiro, lidera a sua produção, primordialmente destinada ao consumo interno (EMBRAPA, 2019). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os cinco países que mais produzem limão são: Índia, México, China, Argentina e Brasil, respectivamente (FAO, 2016).

2.2 O CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é um dos problemas mais antigos que atingem a citricultura. Estudos demonstram que essa doença estava presente em folhas de *C. medica* L. coletadas em regiões da Índia no século XVII (OLIVEIRA *et al.*, 2008; FAWCETT & JENKINS, 1933). Sua origem está atrelada à história do surgimento dos cultivos de citros, o qual iniciou-se há aproximadamente 2.000 a. C. no leste da Ásia (FERNANDES, 2010). Posteriormente, a doença teria chegado à América em 1911 e ao continente africano em 1916, através de navios japoneses contendo bagagens contaminadas (FAWCETT, 1936). Atualmente, a doença é endêmica em vários países da Ásia, como China, Japão e Índia, os quais são importantes produtores mundiais de citros (FERNANDES, 2010).

No Brasil, há relatos iniciais do cancro cítrico em 1957, na região de Presidente Prudente, SP (KIMATI & GALLI, 1980). Sua disseminação espalhou-se, então, para os estados de Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rondônia (FERNANDES, 2010).

Hoje em dia, há uma atenção especial voltada para a incidência do cancro cítrico na região do Cinturão Cítrico brasileiro. Segundo dados coletados em 2020 pela Fundecitrus, o cancro está presente em mais de 17% das árvores de citros

localizadas nessa região, valor 15% superior ao registrado em 2019. Esse aumento está relacionado com a mudança do status fitossanitário do local para "Área Sob Mitigação de Risco (SMR)", o qual permite a manipulação de plantas contaminadas nos próprios pomares. Atualmente, as regiões com maior incidência do cancro cítrico são Votuporanga, São José do Rio Preto, Bebedouro e Matão, respectivamente (Fundecitrus, 2020).

Há muitos fatores que tornam o cancro cítrico uma doença de grande relevância na agricultura. Um deles está associado aos prejuízos causados para os citricultores, uma vez que isso acarreta um aumento nos custos de produção devido ao manejo integrado e à erradicação de plantas contaminadas. Outra dificuldade está relacionada com a comercialização, já que regiões contaminadas precisam "quarentenar" os frutos aparentemente saudáveis a fim de se evitar a proliferação da doença (AMARAL, 2003; VIEIRA, 2018).

O cancro cítrico é uma doença que se estabelece em um ciclo de quatro fases. A primeira delas é a disseminação, na qual plantas previamente contaminadas favorecem a chegada do patógeno a novos hospedeiros, que podem ser plantas totalmente sadias ou os tecidos sadios de uma planta infectada. A forma mais comum de proliferação do cancro cítrico se dá através do manuseio de culturas contaminadas, além da disseminação através de agentes climáticos, como chuva e vento (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017; BRUNINGS & GABRIEL, 2003).

A entrada da bactéria no tecido hospedeiro dá início à segunda fase do ciclo: a infecção. Ela pode ocorrer por meio de aberturas naturais da planta, tais como os estômatos, ou por ferimentos mecânicos presentes na superfície vegetal. A presença de larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) também está associada à ocorrência de cancro cítrico, uma vez que as lesões provocadas por ela facilitam a penetração da bactéria no hospedeiro. Um fator essencial para o sucesso da infecção é a presença de água na superfície a ser infectada. (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017). Folhas e ramos são mais suscetíveis ao cancro nas seis primeiras semanas após o início do seu crescimento. Já no caso dos frutos, a infecção se dá preferencialmente 90 dias após a queda das pétalas. Depois desse estágio, a planta possui maior probabilidade de resistir à infecção (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000; AMARAL, 2003).

A colonização, etapa que se sucede à infecção, é o início da doença propriamente dita. É nessa fase que começam a aparecer os primeiros sintomas da

doença. A severidade das infecções pode variar de acordo com a espécie infectante, condições climáticas e medidas de controle empregadas (DAS, 2003). Apesar de não possuir um mecanismo ativo de penetração através da parede celular, a bactéria causadora do cancro é capaz de infectar folhas, ramos e frutos. As lesões são constituídas por pequenas manchas circulares salientes de coloração marrom claro, podendo atingir alguns centímetros de diâmetro. Nos frutos, em estágios mais avançados de infecção, essas lesões podem romper a casca e causar a perda do alimento. Nas folhas, a bactéria promove lesões salientes em ambos os lados, podendo ocorrer o aparecimento de anéis amarelados ao seu redor. Já nos ramos as lesões tomam forma de uma crosta parda e saliente (Figura 1). Em situações mais severas, há o desfolhamento e deformação, além da queda dos frutos (NERO, 2006; CARNIELLI *et al.*, 2017; VIEIRA, 2018; BRUNINGS & GABRIEL, 2003; MOREIRA *et al.*, 2004).



Figura 1. Lesões de cancro cítrico em frutos, ramos e folhas. Fonte: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>.

O cancro cítrico, ao contrário de outras bacterioses, não é uma doença sistêmica, desenvolvendo-se de maneira pontual somente na região infectada. Nesse local, há a liberação de enzimas que degradam a parede celular das células adjacentes para obtenção de nutrientes, o que provoca a necrose das mesmas. As

bactérias prosseguem a colonização de forma radial, alimentando-se da lise celular das margens das lesões. O fator crítico nessa etapa é a temperatura ideal para o crescimento bacteriano, que varia de 25 a 35 °C (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).

A última etapa consiste na sobrevivência, onde a bactéria precisa encontrar meios para se manter viva e se multiplicar, iniciando uma nova fase de disseminação. A hipertrofia e hiperplasia induzidas pelo patógeno nas células vegetais são essenciais para que a epiderme seja rompida e a bactéria alcance a superfície do tecido, sendo então capaz de dar início a um novo ciclo (BEHLAU & BELASQUE Jr., 2014).

2.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DO CANCRO CÍTRICO

Os agentes etiológicos causadores do cancro cítrico são bactérias Gram-negativas pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Esse gênero compreende mais de 100 espécies distintas de microrganismos predominantemente fitopatogênicos que, além de incluírem patógenos de citros, também abrangem uma série de indivíduos que causam doenças em cultivos de tomate, cana-de-açúcar, arroz, dentre outros (MÜHLDORFER & SCHÄFER, 2001; FERNANDES, 2010; ADRIKO; MBEGA; MORTENSEN, 2014).

Sua morfologia é baciliforme, apresentando o formato de bastonetes com um único flagelo polar, sendo microrganismos aeróbios obrigatórios e quimiorganotróficos. Por não produzirem esporos, essas bactérias possuem um tempo de vida muito curto quando não estão associadas ao tecido do hospedeiro. Além disso, as várias espécies possuem diferentes graus de patogenicidade, as quais se diferem pela especificidade bactéria-hospedeiro, morfologia, fisiologia, bioquímica e sorologia (FERNANDES, 2010; ROSSETTI; MULLER; COSTA, 1993; BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017). Sua temperatura de crescimento ideal varia de 25 a 35 °C, apresentando colônias lisas e viscosas. A coloração amarela usual se deve pelo pigmento xantomonadina, e é a motivação para a nomeação do gênero (do grego, *Xanthos*: amarelo) (BÜTTNER & BONAS, 2010; RYAN *et al.*, 2011).

Existem três espécies principais de *Xanthomonas* causadoras de cancro cítrico. A cancrose A, também conhecida como cancro asiático, é promovida pela infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Essa variação da doença teve origem na Ásia

e é a mais severa de todas, possuindo o maior espectro de hospedeiros de citros e a maior distribuição geográfica mundial (SCHAAD, 2006).

O segundo tipo, denominado de cancrose B ou falso cancro, tem maior ocorrência em países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo causado pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB). Essa estirpe é menos patogênica do que a Xac e infecta um menor número de hospedeiros, sendo os principais o limão verdadeiro (*Citrus limon*) e limas ácidas (*Citrus aurantifolia*). Seus sintomas são parecidos com os da cancrose A, porém levam mais tempo para ser detectados visualmente (SCHAAD, 2006; GOTO; TAKAHASHI; MESSINA, 1980; MOREIRA *et al*, 2010).

A cancrose C, causada pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC), é uma doença restrita ao Brasil (estado de São Paulo), apresentando infecções em lima ácida galego e citrumelo “Swingle” (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) (MALAVOLTA JUNIOR *et al.*, 1984; NOCITI; CAMARGO; RODRIGUES NETO, 2006; MOREIRA *et al*, 2010). Tanto a cancrose B quanto a C não apresentam uma relevância econômica tão grande quanto a cancrose A, mas são causadas por espécies bacterianas quarentenárias em países da União Europeia e do norte da África e Austrália (PRUVOST *et al.*, 2015).

Além desses três tipos principais, ainda existe a espécie *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), causadora da “mancha bacteriana dos citros” em regiões da Flórida, EUA. Ela afeta especialmente o citrumelo “Swingle” (SCHAAD, 2006).

2.4 MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO E CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO

O diagnóstico do cancro cítrico é, na maioria das vezes, realizado de forma visual, devido ao fato de que as características de seus sintomas são muito bem elucidadas e conhecidas. No entanto, a identificação de maneira precoce é interessante para que a erradicação seja feita mais rapidamente; e, além disso, há casos em que é preciso um método mais confiável para certificar a presença da doença. Nesse sentido, existem testes de diagnóstico capazes de identificar a presença bacteriana em uma planta até mesmo antes que os sintomas comecem a se apresentar (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017). Além das técnicas de isolamento da bactéria, sequenciamento, patogenicidade e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), há no mercado um teste sorológico para uso em campo, baseado na

identificação de uma ou mais proteínas do agente etiológico através de uma técnica simples, barata, de fácil aplicação e com a vantagem de gerar um resultado rápido e seguro (Figura 2) (MANYAM & NARGUND, 2020; BEHLAU & BELASQUE Jr., 2014).

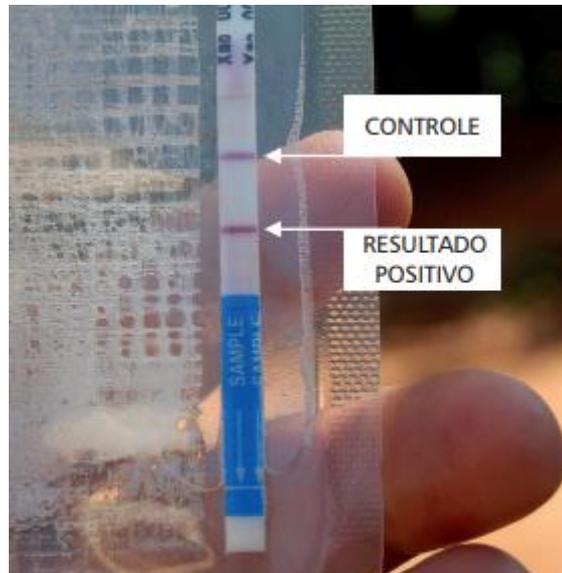


Figura 2. Teste sorológico para detecção de cancro cítrico. A banda controle indica que o teste foi realizado corretamente, e a segunda banda informa a presença da bactéria causadora do cancro cítrico. As duas bandas devem ser reveladas para que o teste seja considerado positivo. Fonte: Fundecitrus, 2017.

Historicamente, o controle do cancro cítrico vem sendo primordialmente realizado através de estratégias de erradicação que visam eliminar os focos da doença e diminuir as chances de disseminação da mesma. Esse método funciona como uma abordagem preventiva, aproveitando-se das características biológicas do patógeno, como proliferação lenta e condições ambientais específicas, para restringir o avanço da doença de locais contaminados para áreas de plantios saudáveis (NAMEKATA, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Usando essa estratégia, a erradicação do cancro cítrico foi realizada com êxito na África do Sul, Nova Zelândia e Austrália (KIMATI & GALLI, 1980). Em outros países, como Estados Unidos e Brasil, essa abordagem vem sendo empregada há décadas e se mostrou essencial para que a doença não se tornasse endêmica, como ocorrido anteriormente na Argentina e no Japão (NAMEKATA, 1991).

Em 1957, logo após a chegada do cancro cítrico ao Brasil, deu-se início ao Programa de Erradicação do Cancro Cítrico, coordenado pela Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. As medidas que compunham esse programa foram baseadas em estratégias previamente adotadas nos EUA (BEHLAU;

FONSECA; BELASQUE, 2016; BEHLAU, 2020; DOPSON, 1964). No início, os protocolos visavam a erradicação das plantas contaminadas e a remoção de plantas assintomáticas em um determinado raio ao redor do foco da doença, seguido de inspeções a cada 90 dias no local e áreas vizinhas. No entanto, essas estratégias não foram muito eficazes, o que provocou a criação de um protocolo mais severo no qual todas as plantas de citros eram removidas em áreas contaminadas, independentemente de serem sintomáticas ou não. Adotou-se, também, um rastreamento mais severo no trânsito de materiais vegetais em rodovias e estradas (SANTOS, 1991). O programa sofreu várias alterações ao longo das décadas. Mais recentemente, os protocolos se tornaram menos rigorosos e aboliram a necessidade de remoção de plantas assintomáticas em áreas infectadas, permitindo até mesmo a permanência de frutos contaminados caso a destinação seja dentro de uma mesma região (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE, 2016; BEHLAU, 2020; BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).

Atualmente, a Instrução Normativa MAPA nº 21, de 25/05/2018, determina que as estratégias de controle a serem adotadas dependem do status fitossanitário da doença na área, que podem ser quatro: 1 - Área Sem Ocorrência: estados do país sem histórico da doença. Nessas regiões, deve-se prezar pela prevenção da entrada do cancro cítrico no estado; 2 - Área Livre de Praga (ALP): área específica sem ocorrência da doença em estados onde ela está presente. Nesses locais, as medidas também são preventivas no sentido de conter a entrada de materiais vegetais contaminados; 3 - Área Sob Erradicação: locais onde a doença ocorre de forma restrita em estados em que a doença já está instaurada. Nessas áreas, o controle é feito através do plantio de mudas sadias e eliminação de plantas contaminadas ou com suspeita de contaminação; 4 - Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR): área onde há distribuição grande do cancro entre as plantas de citros em estado onde há presença da doença. Nestes locais, o controle é feito através de um conjunto de medidas de manejo para reduzir o impacto na produção e comercialização dos frutos (SAA São Paulo, 2020; BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).

Uma medida de controle simples e bastante eficaz é a aquisição de mudas sadias de citros, com certificados que comprovem a saúde da planta. Essa estratégia pode ser aliada com a utilização de variedades resistentes ou menos suscetíveis ao cancro cítrico, o que reduzirá o custo com medidas de controle complementares. Também se recomenda o emprego de quebra-ventos e o controle do inseto Minador

dos Citros (*Phyllocnistis citrella*). Todas essas medidas funcionam como formas de prevenção para a entrada do cancro cítrico em plantas saudáveis. As medidas curativas, por outro lado, são poucas e se baseiam principalmente na pulverização de compostos a base de cobre em plantas previamente infectadas, como oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso. Esses compostos são praticamente insolúveis em água, o que provoca um resíduo na planta. Assim, forma-se uma barreira protetora que age evitando o avanço da infecção (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017; BEHLAU *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, muito vem sendo estudado para que novas medidas curativas e de prevenção contra o cancro cítrico sejam desenvolvidas. O controle biológico utilizando espécies de bactérias do gênero *Bacillus* foi recentemente descrito como uma estratégia promissora (DAUNGFU; YOUNPENSUK; LAMYONG, 2019). Além disso, existe uma grande procura por variedades transgênicas de citros que sejam resistentes a infecções por *Xanthomonas* e por informações moleculares da bactéria que possam fornecer dados na criação de estratégias de controle mais eficazes (MENDES *et al.*, 2010; FURMAN *et al.*, 2013).

2.5 COMPOSTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O fato de que plantas podem fornecer proteção contra determinadas enfermidades foi descoberto muito antes que os homens soubessem da existência de microrganismos. Desde a antiguidade os seres humanos utilizam-se de componentes da natureza como forma de tratamento contra doenças, construindo-se um campo da medicina tradicional que compreende as chamadas “plantas medicinais” (RÍOS & RECIO, 2005). Há estudos mostrando que a origem do uso de plantas para fins terapêuticos data de 2.500 a. C., quando o imperador chinês Shen Nung catalogou 365 ervas medicinais e venenos sob inspiração divina (FIRMO *et al.*, 2011).

Posteriormente, com intensos esforços no sentido de compreender mais a fundo os princípios existentes por trás dessas plantas, foi evidenciado que a principal fonte de atividade antimicrobiana presente nos extratos vegetais está relacionada com a composição dos chamados óleos essenciais (RÍOS & RECIO, 2005). Esses óleos, também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são líquidos aromáticos oleosos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, podendo-se extraí-los de flores, botões, folhas, ramos, cascas, sementes, frutos, raízes e rizomas (GEROMINI *et al.*,

2012; SARTO & ZANUSSO JUNIOR, 2014). Essa variedade de regiões para extração está relacionada com a grande distribuição dos órgãos vegetais responsáveis por excretar esses óleos pelas estruturas da planta, tais como tricomas glandulares, dutos e cavidades secretoras ou células oleosas (SAMUELSSON, 1999; PEREIRA, 2010).

Os óleos essenciais são compostos extremamente complexos do ponto de vista químico. Eles são constituídos principalmente por terpenos, moléculas cuja unidade conformacional básica consiste em um número de átomos de carbono múltiplo de cinco. Os terpenos mais abundantes em óleos essenciais são os monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}) (Figura 3). Eles podem ser acíclicos, mono ou bicíclicos, gerando produtos oxigenados como álcoois, aldeídos, cetonas e compostos aromáticos (fenóis e éteres). Além dessas moléculas, os óleos essenciais também possuem ácidos orgânicos de baixo peso molecular e cumarinas. Todos esses componentes estão relacionados com a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (SIMÕES; GOSMANN; SCHENKEL, 1999; PEREIRA, 2010).

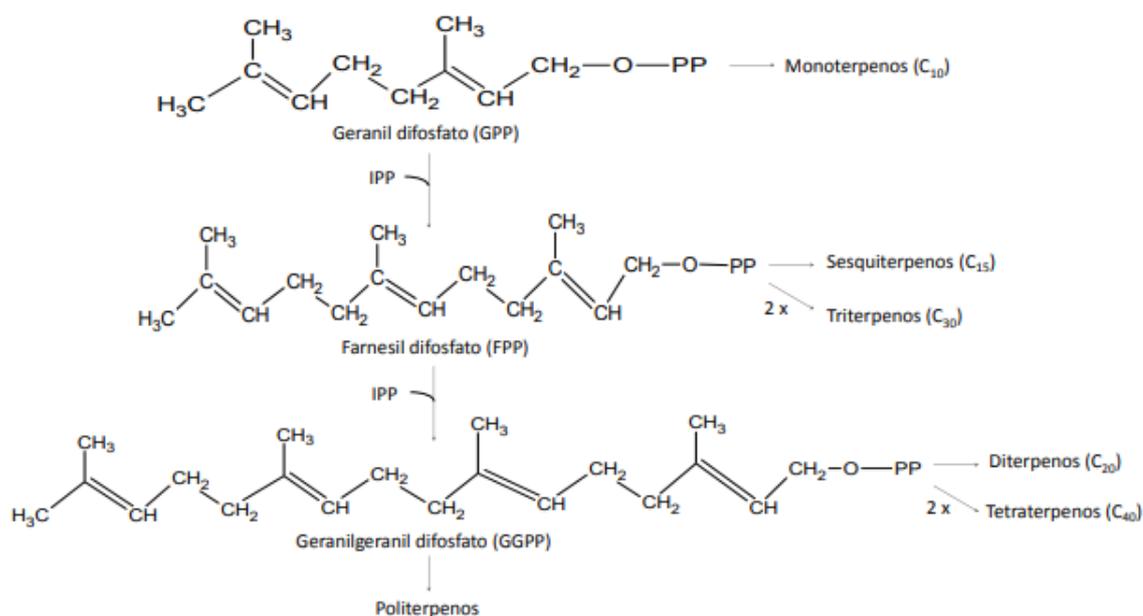


Figura 3. Fragmento da rota da síntese de terpenos, com as diferenças nas estruturas de mono, sesqui e diterpenos. Fonte: Martins, 2012.

Variados mecanismos de ação já foram propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. É sabido que os OEs são constituídos por uma grande quantidade de compostos com potencial antimicrobiano, de modo que sua atividade não deve ser atribuída a apenas um componente (COX *et al.*, 2000; BAJPAI;

BAEK; KANG., 2012). Dentre seus principais compostos destacam-se as estruturas fenólicas, que possuem a capacidade de alteração da permeabilidade celular e destruição de membranas citoplasmáticas, ocasionando morte da célula (BAJPAI; BAEK; KANG., 2012; LI *et al.*, 2011). Além disso, por serem lipofílicos, esses óleos conseguem penetrar a membrana e provocar diferentes danos intercelulares, como a inativação de algumas enzimas que afetam a síntese de ácidos nucleicos e o metabolismo energético microbiano (BAKKALI *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2015). No entanto, a complexidade da ação dos óleos essenciais ainda não foi inteiramente elucidada (CALO, 2015).

2.5.1 Eugenol

O eugenol (4-Alil-2-metoxifenol) é um composto aromático presente no óleo essencial de plantas pertencentes às famílias *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Myristicaceae*, sendo muito conhecido por ser o constituinte principal do óleo de cravo-da-índia. É um hidroxifenil propeno anifático cuja fórmula $C_{10}H_{12}O_2$ foi inicialmente descoberta em 1929, possuindo uma solubilidade considerável em solventes orgânicos e água (MARCHESE *et al.*, 2017).

Há muitos estudos descrevendo o potencial antiviral, bactericida e fungicida do óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), e essa atividade antimicrobiana é atribuída à alta proporção de eugenol presente em sua composição, que pode variar de 80 a 95% (OLIVEIRA & ABREU, 2012; MARCHESE *et al.*, 2017). Como acontece para a maioria dos constituintes de óleos essenciais, há uma grande quantidade de mecanismos propostos para elucidar a atuação antimicrobiana do eugenol. Alguns autores explicam essa atividade através da presença de um grupo hidroxila livre na molécula, o qual pode se ligar a proteínas e inibir a ação enzimática da maquinaria celular (NAZZARO; FRANTIANNI; DE MARTINO, 2013; BURT, 2004; WENDAKOON & SAKAGUCHI, 1993). Além disso, existem outros mecanismos propostos, como: alterações nos ácidos graxos da membrana plasmática; mudanças na morfologia celular e disrupção da membrana plasmática; e efeito no transporte de íons e ATP (MARCHESE *et al.*, 2017).

Estudos relatam o uso de eugenol, bem como do óleo essencial de cravo-da-índia, para o controle de múltiplos fungos e bactérias causadoras de doenças em humanos e de importância na agricultura. Ele se mostrou eficiente contra fungos do

gênero *Candida*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, entre outros. Bactérias de interesse médico, como as dos gêneros *Streptococcus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, também se mostraram sensíveis ao uso de eugenol (MARCHESE *et al.*, 2017; DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994).

Recentemente, no Brasil, foi proibido o uso de hipoclorito de sódio na desinfecção de frutos para exportação à União Europeia. Uma alternativa utilizada foi o emprego de eugenol principalmente em limões, a fim de se evitar o aparecimento de cancro cítrico. Um informativo do Centro de Citricultura, 2020, relata a diminuição drástica de bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na superfície de limões Tahiti após o uso de eugenol (Centro de Citricultura, 2020). No entanto, ainda são poucos os estudos mais aprofundados acerca das doses mínimas necessárias para a erradicação da bactéria.

2.5.2 Timol

Os óleos essenciais de tomilho e orégano são conhecidos por possuir um largo espectro de atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos (FALCONE *et al.*, 2005). Dentre os principais compostos presentes nesses óleos estão em destaque os isômeros timol e carvacrol, moléculas aromáticas hidrofóbicas que constituem cerca de 50 a 85% de suas composições (GUARDA *et al.*, 2011; KULISIC *et al.*, 2004).

O timol é um composto fenólico monoterpênico de fórmula $C_{10}H_{13}OH$ e denominação química 5-metil-2-(1-metiletil)fenol (NOSTRO *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2001). Sua característica antimicrobiana já é bem descrita e demonstrada na literatura; no entanto, há lacunas a serem preenchidas no que se refere aos mecanismos que conferem essa capacidade ao timol (FERREIRA *et al.*, 2016). Estudos com *E. coli* atribuíram a ação antibacteriana à despolarização e permeabilidade da membrana citoplasmática ocorridas na presença de timol (XU *et al.*, 2008). Outros autores sugerem que a ruptura da membrana plasmática ocasionada pelo composto pode estar primordialmente relacionada à atividade antimicrobiana do timol, mecanismo esse que é o mais aceito atualmente (CONNELL; LI; SHI, 2013; TROMBETTA *et al.*, 2005).

O timol é denominado como um dos agentes antimicrobianos mais ativos dentre todos os compostos extraídos de óleos essenciais, sendo muito eficaz até

mesmo contra cepas bacterianas e fúngicas resistentes a antibióticos (FALCONE *et al.*, 2005; MEMAR *et al.*, 2017). Por essa razão, sua ação contra microrganismos de interesse médico e agro é constantemente explorada. Ele se mostrou eficaz contra fungos dos gêneros *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria* e *Rhizoctonia* (dentre outros), bem como contra bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (dentre outras) (ZHANG; GE; YU, 2018; ZHANG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018; RÚA *et al.*, 2019; GANIYU *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2018). Há estudos que demonstram uma possível atividade contra espécies de *Xanthomonas* causadoras de cancro cítrico; no entanto, a maioria ainda não foi concluído ou não há resultados muito claros, o que evidencia a necessidade de novas pesquisas (ZAMUNER, 2019; NICULAU *et al.*, 2019).

2.5.3 Geraniol

Geraniol é o nome comumente dado à mistura dos isômeros nerol e geraniol, encontrados principalmente no óleo essencial de *Monarda fistulosa* e muitas flores com odor característico. Esse composto possui a fórmula química $C_{10}H_{18}O$ e a denominação 3,7-dimetilocta-trans-2,6-dien-1-ol, sendo um álcool monoterpeneo alifático acíclico (CHEN & VILJOEN, 2010; LIRA *et al.*, 2020). O geraniol também é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de palmarosa e citronela (BAYBAR & BAYBAR, 2005; RAJESWARA RAO *et al.*, 2004).

O geraniol possui várias ações biológicas descritas, como atividade inseticida, anti-helmíntica, antiinflamatória, antitumoral e antimicrobiana. Essa última, em especial, vem chamando a atenção como uma alternativa para o controle de microrganismos patogênicos, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Colletorichum camelliae* e outros (CHEN & VILJOEN, 2010; BARD *et al.*, 1988). Em estudo recente, 78 diferentes microrganismos, entre bactérias e fungos, demonstraram susceptibilidade ao geraniol (LIRA *et al.*, 2020).

A característica lipofílica do geraniol pode estar relacionada com os mecanismos envolvidos na sua capacidade antimicrobiana, o que explica sua habilidade de se aderir aos lipídeos da membrana celular dos microrganismos. Essa aderência faz com que ocorra uma mudança nos componentes e na estrutura da

membrana, tornando-a mais permeável e promovendo sua destruição (COUTINHO *et al.*, 2015; MAREI; RASOUL; ABDELGALEIL, 2012; LIRA *et al.*, 2020).

Alguns óleos essenciais contendo o geraniol como um dos principais constituintes já se demonstraram eficazes no controle de espécies de *Xanthomonas* promotoras do cancro cítrico (MIRZAEI-NAJAFGHOLI *et al.*, 2017; MIRZAEI-NAJAFGHOLI *et al.*, 2016). Porém, estudos utilizando apenas o composto majoritário são quase inexistentes contra esses fitopatógenos, o que demonstra a relevância de novas pesquisas voltadas a esse campo.

2.5.4 Mentona

A mentona (5-Metil-2-(1-metiletil)ciclohexanona) é um composto de fórmula química $C_{10}H_{18}O$ presente em plantas da família *Lamiaceae*, as quais o produzem como uma resposta de defesa frente a um ataque a patógenos. Ela é um dos principais constituintes no óleo essencial da maioria das espécies do gênero *Mentha*, existindo na forma de dois isômeros: mentona e isomentona (MARTÍNEZ, 2016). A espécie *Mentha piperita* L., comumente conhecida por hortelã-pimenta, vem sendo muito empregada em ensaios de atividade antimicrobiana, apresentando-se como uma forte alternativa contra microrganismos no pós-colheita de frutas e hortaliças (NEJAD; MILANI; AFSHAR, 2015). Essa propriedade está intrinsecamente relacionada ao óleo essencial de hortelã-pimenta e seus componentes, dentre os quais se destacam o mentol e a mentona (VALENTE *et al.*, 2016).

A mentona já se mostrou eficiente no controle de fungos, bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas. Alguns exemplos de microrganismos susceptíveis à mentona são: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (NEJAD; MILANI; AFSHAR, 2015). Sua ação bactericida está relacionada com mecanismos envolvidos na lise e perda de integridade da membrana celular, devido a mudanças que acarretam na saída de íons de hidrogênio, potássio e cálcio, o que inviabiliza processos celulares vitais (TREVISAN, 2017).

Alguns extratos vegetais provenientes de *M. piperita* L já demonstraram uma atividade antibacteriana significativa contra espécies do gênero *Xanthomonas* (KULSHRESTHA *et al.*, 2015). No entanto, são escassos os estudos envolvendo a

utilização isoladamente de mentona em contato com bactérias causadoras do cancro cítrico.

2.5.5 Óleo essencial de gengibre

O gengibre (*Zingiber Officinale* Roscoe) é um tubérculo de origem asiática de utilidade mundial. Além de ser usado na culinária como especiaria, também apresenta diversas propriedades medicinais (NICÁCIO, 2018). Ele vem sendo empregado desde a antiguidade no tratamento de muitas doenças, como: artrite, câimbras, reumatismo, torções, dores de garganta, dores musculares, constipação, vômitos, hipertensão e doenças infecciosas (ALI *et al.*, 2008). Além dessas aplicações, uma das principais propriedades desse vegetal é o seu potencial uso como agente antimicrobiano.

Muitos estudos comprovam que o óleo essencial de gengibre (OEG) possui características antimicrobianas (SINGH *et al.*, 2008; DEBBARMA *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2005; YAMANOTO-RIBEIRO *et al.*, 2013). Isso se deve à grande quantidade de componentes bioativos presentes no OEG, que variam em mais de 50. Há, no entanto, uma divergência quanto à composição do óleo essencial de gengibre, uma vez que diferentes autores reportam compostos distintos em quantidades distintas. Isso pode estar relacionado a diversos fatores, que vão desde à variabilidade genética do material utilizado até alterações ambientais e métodos de extração do óleo (DABAGUE *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2005; 2008).

De modo geral, o OEG contém sesquiterpenos hidrocarbonados como zingibereno, ar-curcumeno, b-bisaboleno e b-sesquifelandreno e monoterpenos como geranial, neral e canfeno (WOHLMUTH *et al.*, 2006). Dabague *et al.* (2011) apresentou um estudo em que o constituinte primordial do óleo de gengibre foi o geranial, seguido de geraniol, acetato de géranile, eucaliptol, canfeno, zingibereno, b-felandreno e b-bisaboleno, respectivamente. Em contrapartida, Singh *et al.* (2005) encontrou como principais constituintes: a-zingibereno, canfeno, ar-curcumeno, b-sesquifelandreno, b-felandreno, geranial e outros componentes, respectivamente.

A composição do óleo essencial de gengibre torna ele um grande candidato para o controle de doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos; no entanto, há poucos estudos investigando sua atividade contra bactérias de interesse na agricultura (AMORIM *et al.*, 2011).

2.6 NANOTECNOLOGIA APLICADA À AGRICULTURA

A nanotecnologia é uma das estratégias mais promissoras no que tange à área da agricultura (DUHAN *et al.*, 2017). O prefixo "nano", originário do Grego, refere-se a uma escala de medida na ordem de 10^{-9} , ou a bilionésima parte de um metro. Um nanomaterial, portanto, diz respeito àqueles com tamanho entre 1 e 100 nm (HUANG *et al.*, 2015; RAI & INGLE, 2012). Há autores, no entanto, que possuem diferentes definições para um nanomaterial, levando em consideração partículas entre 20 e 500 nm (SOLANS *et al.*, 2005). Por possuírem características físicas e químicas peculiares, a observação, medição e manipulação de materiais na escala nanométrica abre caminhos para muitas possibilidades de aplicações em áreas diversas (SMITH; SHAW; HANDV, 2007; HUANG *et al.*, 2015).

Na agricultura, a nanotecnologia surge como uma solução alternativa ao problema causado pelo aumento populacional e a necessidade de técnicas de produção mais efetivas. Seu papel pode ser de grande impacto na procura por uma agricultura mais sustentável, oferecendo meios de se ter uma menor utilização de agroquímicos e menos riscos de grandes impactos à natureza. Entretanto, deve-se ter cautela no uso de materiais nanoestruturados, uma vez que possíveis danos ambientais e à saúde humana não possam ser descartados (GOGOS; KNAUER; BUCHELI, 2012; FRACETO *et al.*, 2016; SERVIN *et al.*, 2015; KAH, 2015; SCOTT & CHEN, 2013).

Um dos grandes desafios para a aplicação de óleos essenciais ou seus componentes como agentes antimicrobianos na agricultura está relacionado com suas altas taxas de propriedades reativas e hidrofóbicas. Para que eles sejam melhores dispersos é necessária a emulsificação dos OEs, o que garantirá sua ação contra possíveis fitopatógenos (DONSI & FERRARI, 2016; DONSI *et al.*, 2011). Nesse sentido, uma emulsão é caracterizada por um sistema termodinamicamente instável, onde há a mistura de dois líquidos imiscíveis através de homogeneização mecânica e adição de um agente surfactante. De acordo com a hidrofilia ou lipofilia da fase dispersante, as emulsões podem ser classificadas como óleo em água (O/A), em que a fase dispersante é água e o óleo se encontra em menor volume, ou água em óleo (A/O) em que acontece o inverso: o óleo é a fase dispersante e é adicionado um menor volume de água (KALE & DEORE, 2017).

A estabilidade dessas emulsões se dá através do emprego de agentes surfactantes, que funcionam como agentes que diminuem a tensão superficial e recobrem os glóbulos com um filme que estabiliza o sistema (PEREIRA, 2011). A escolha desses agentes pode ser baseada no seu valor de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), que representa o tamanho e a força das porções hidrofílicas e lipofílicas de uma molécula de surfactante. A escala de HLB varia de 0 a 20, sendo que os surfactantes presentes na faixa de 3.5 a 6.0 são mais adequados para emulsões A/O, e os com valores entre 8 e 18 são mais recomendados para emulsões O/A. Quanto maior forem as cadeias de ácidos graxos que constituem o surfactante e seu grau de esterificação, maior será o valor de HLB (ZHENG *et al.*, 2015; GRIFFIN, 1949).

Uma nanoemulsão, por outro lado, é uma emulsão em que as partículas da fase dispersa possuem um diâmetro dentro da escala nanométrica. Elas podem ser obtidas utilizando-se diferentes métodos, divididos de acordo com o nível de energia requerido para a diminuição das partículas (alto, baixo ou uma combinação de ambos). Dentre os métodos que exigem alta energia, a obtenção de nanopartículas através de agitação pode ser combinada ao uso de agentes emulsificantes de modo a se preparar uma nanoemulsão. Nesse caso, quanto maior a velocidade de agitação, menor deve ser o tamanho das partículas obtidas (KOROLEVA & YURTOV, 2012; OTONI *et al.*, 2014). Para a caracterização das nanoemulsões, são utilizados equipamentos que podem medir o tamanho das partículas na fase dispersa por meio de uma técnica denominada Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), que consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em determinado ângulo quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz (BERNE & PÉCORA, 2000; MALVERN PANALYTICAL, 2020).

Nesse sentido, o uso da nanotecnologia para obtenção de nanoemulsões vem sendo considerado como uma forma de aumentar ainda mais a eficiência da emulsão, uma vez que os OEs em escala nanométrica minimizam o impacto nas características organolépticas do vegetal e aumentam sua difusão celular, implicando em uma bioatividade maior. Ou seja, quanto menor a partícula da nanoemulsão, maior pode ser a ação antimicrobiana dos componentes utilizados. Além disso, a nanoemulsão atua como um estabilizante das propriedades físico-químicas do óleo essencial e pode diminuir a sua volatilidade (DONSI *et al.*, 2011; DONSI & FERRARI, 2016). A estratégia do uso de nanoemulsões de óleos essenciais e seus componentes para o

controle de espécies de *Xanthomonas* já se mostrou eficaz em estudos *in vitro* (KUMARI *et al.*, 2018; MENDONÇA; ZAMBOLIM; BADEL, 2017).

Existe atualmente uma crescente preocupação com o consumo de alimentos orgânicos e que durem mais tempo na mesa do consumidor. Uma das possíveis alternativas para que isso seja feito é a produção de revestimentos a partir de fontes naturais para serem aplicados em frutas, hortaliças e demais vegetais de interesse (PEREIRA *et al.*, 2013). Quando são revestidos, esses vegetais demonstram uma menor perda de água e baixa incidência de microrganismos patogênicos. Assim, além do brilho artificial que agrada ao consumidor, os revestimentos retardam o amadurecimento da fruta e reduzem suas perdas pós-colheita (RIBEIRO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2013). Esses revestimentos variam em textura e formulação, podendo inclusive conter óleos essenciais como agente antimicrobiano (CRUZ *et al.*, 2012). No caso do cancro cítrico, tais revestimentos bioativos são interessantes alternativas para se evitar a disseminação da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação antibacteriana de diferentes nanoemulsões de eugenol, timol, geraniol, mentona e óleo de gengibre por meio de ensaios *in vitro* com as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer relações entre a atividade antimicrobiana das nanoemulsões de eugenol, timol, geraniol, mentona e óleo de gengibre com o tamanho das partículas produzidas e seus diferentes métodos de obtenção;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões ao longo do tempo;
- Determinar as concentrações mínimas inibitórias (MIC) das nanoemulsões contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*;
- Determinar as concentrações mínimas bactericidas (MBC) das nanoemulsões contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS NATURAIS

Os compostos naturais utilizados nos experimentos estão listados a seguir, todos obtidos por meio da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda©: Óleo essencial de gengibre (W252204), Geraniol (163333), Eugenol (E51791), Timol (T0501) e Mentona (95401). Os compostos foram mantidos fora do alcance da luz, em temperatura ambiente, conforme especificações dos produtos.

3.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Ambos microrganismos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada (LBBMM), do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, SP, Brasil. As cepas são de origem da coleção do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Araraquara, SP, Brasil.

As cepas selecionadas foram:

- *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (Xac). Isolada da região de Paranavaí, PR, Brasil. Tem como hospedeiro *Citrus* spp., e é causadora do Cancro cítrico A (MOREIRA *et al.*, 2010).
- *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* 11122/1631 (Xau-B). Isolada da Argentina. Tem como hospedeiro *C. limon*, *C. sinensis* e *C. paradisi*, e é causadora do Cancro cítrico B (MOREIRA *et al.*, 2010).

A manutenção das bactérias foi realizada em meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio) e sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio, 15 g/L de ágar bacteriológico) (SOARES *et al.*, 2015; EMBRAPA, 1999). Repiques periódicos foram feitos para viabilização dos ensaios.

3.3 PRODUÇÃO DOS INÓCULOS

Os inóculos de ambas bactérias foram feitos a partir de placas com meio LB sólido cultivadas por 3 dias, incubadas em estufa a 28°C. Aproximadamente duas

colônias isoladas de cada microrganismo foram coletadas com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, transferidas para 50 mL de meio de cultura líquido LB esterilizado e mantidos sob agitação a 180 rpm e 28°C por 24 horas. Após esse período, uma alíquota de 1 mL de cada cultivo foi coletada e lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm. A leitura de absorbância foi comparada com a leitura de uma solução correspondente ao ponto 0,5 da Escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foram, então, realizadas diluições em LB líquido de modo a se obter inóculos padronizados de cada bactéria com a concentração de 2×10^5 UFC/mL. A confirmação da concentração foi feita plaqueando-se 100 µL desse inóculo em meio LB sólido, com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril (SANTISTEBAN, 2015; MORENO *et al.*, 2006).

3.4 PRODUÇÃO DAS NANOEMULSÕES DOS PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais foram diluídos em água destilada esterilizada de modo a se obter as seguintes concentrações finais:

- OE de Gengibre e Geraniol: 2% (v/v);
- Timol: 2% (m/v);
- Eugenol e Mentona: 1% (v/v).

Houve diferença nas concentrações de Eugenol e Mentona com relação às demais amostras devido ao pouco volume disponível. Foi adicionado como agente surfactante Tween 80 a 0.05% (v/v) (MOGHIMI *et al.*, 2015)

Cada amostra foi, então, submetida a agitação por 4 min em Ultra-Turrax em três velocidades diferentes: 7.000, 12.000 e 16.000 rpm, a temperatura ambiente. Assim, foram obtidas três diferentes emulsões para cada uma das cinco amostras, totalizando em 15 tratamentos. As abreviações para cada tratamento estão descritas na Tabela 1. Antes das análises de caracterização, cada tratamento foi submetido ao ultrassom por 10 min, de modo a se ter a dispersão de partículas aglomeradas (OTONI *et al.*, 2014 modificado).

Para fins de praticidade, as nanoemulsões receberam as seguintes abreviações:

Tabela 1. Lista de abreviações para as nanoemulsões preparadas de cada componente.

NANOEMULSÃO	ABREVIÇÃO
Eugenol	NEE
Timol	NET
Geraniol	NEG
Mentona	NEM
Óleo essencial de gengibre	NEOG

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

As nanoemulsões foram caracterizadas com o auxílio do aparelho Zetasizer Nano ZS, realizando-se a análise de tamanho das partículas (em nm) e o índice de dispersão (PDI). Foi coletada uma alíquota e realizada a leitura de cada amostra nos tempos 0h e 24h, de modo a se verificar a estabilidade das nanoemulsões. Entre as leituras, todas as amostras foram mantidas refrigeradas e em recipiente com barreira à entrada de luz (OTONI *et al.*, 2014 modificado).

Os dados foram analisados por meio de análise de variância ANOVA two-way, e quando necessário, as diferenças entre os tratamentos foram determinadas por meio do Teste de Tukey (significância 0.05) para os dados referentes às velocidades de agitação dentro de cada tratamento, e o Teste T de Student (significância 0.05) para comparação entre os tempos de 0h e 24h.

3.6 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC)

Em uma placa estéril de 96 poços, foram depositados 50 µL de meio LB líquido em cada poço, seguido da adição de 50 µL de inóculo bacteriano a 2×10^5 UFC/mL, de modo a se obter uma concentração final de 10^5 UFC/mL em todos os poços, com volume final de 100 µL. As duas bactérias foram testadas separadamente. Em seguida, nos poços da primeira fileira, cada nanoemulsão foi adicionada no volume de 100 µL, reduzindo-se sua concentração inicial pela metade. Foi realizada, então, uma diluição seriada transferindo-se 100 µL do poço inicial para os subsequentes, no

sentido vertical da placa (Figura 3). Assim, todos os tratamentos de NEOG, NEG e NET foram testados nas concentrações finais de 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03, 0.02 e 0.01% (v/v), e os tratamentos de NEE e NEM receberam as concentrações finais de 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03, 0.02, 0.01 e 0.004 % (v/v). Todas as nanoemulsões foram testadas em triplicata. Também foram feitos controles com adição de água destilada a 1 % (v/v) e Tween 80 a 0.05 % (v/v). As placas foram incubadas, sem agitação, a 28°C por 24h (JIANG *et al.*, 2011 modificado).

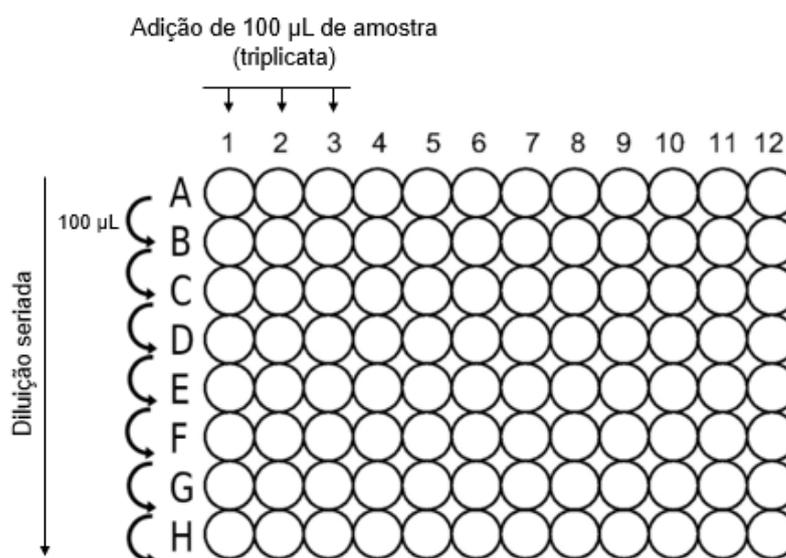


Figura 4. Esquematização da diluição seriada no ensaio de concentração mínima inibitória (MIC).

Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de uma solução de 0.1% (m/v) do reagente 2,3,5-trifeniltetrazólico cloreto em cada poço das microplacas, voltando-as para a incubadora por 30 min. Este reagente é um corante que interage com enzimas envolvidas na respiração celular, de modo a se detectar os poços em que ainda há atividade metabólica (coloração avermelhada). Assim, a MIC foi definida como a menor concentração em que não foi visível nenhuma coloração no poço correspondente (DESWAL & CHAND, 1997).

3.7 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (MBC)

A concentração mínima bactericida foi investigada fazendo-se o plaqueamento em meio LB sólido de 100 µL de cada repetição dos poços em que foi definida a MIC e os subsequentes. O espalhamento da alíquota foi feito utilizando-se alça de Drigalski

estéril. Os controles negativos também foram plaqueados. Todas as placas foram incubadas a 28°C por 24h. A MBC foi definida como a menor concentração de amostra em que não houve crescimento microbiano visível na placa de Petri. (JIANG *et al.*, 2011 modificado).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE

As médias dos valores das caracterizações das nanoemulsões estão descritos na Tabela 2. A maioria delas foi capaz de diminuir o tamanho das partículas (z-average) em suspensão da primeira velocidade de agitação (7.000 rpm) para a segunda (12.000 rpm). Esse resultado coincide com dados já descritos na literatura. Otani *et al.* (2014) utilizou essas mesmas rotações para a produção de nanoemulsões de cinamaldeído e obteve valores mais de duas vezes menores na rotação de 12.000 rpm em comparação à de 7.000 rpm. Isso acontece devido ao fato de que processos que demandam alta energia criam forças deformadoras que superam a pressão de Laplace e quebram as partículas em tamanhos menores (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

O tratamento com geraniol (NEG) foi o único a não apresentar redução no tamanho das partículas, sem nenhuma diferença estatística relevante entre as médias dos valores apresentados para cada uma das três velocidades de agitação, que variaram de 98.7 a 164.8 nm. Isso pode ser devido à múltiplos fatores, como a necessidade de um maior tempo de agitação ou da adição de diferentes tensoativos. Estudos prévios demonstraram que um maior tempo de agitação pode produzir nanoemulsões de geraniol com partículas de até 68 nm de diâmetro (BALTA *et al.*, 2017) e que o uso de tensoativos hidrofílicos associados à lipofílicos reduz as nanopartículas para valores entre 165 e 60 nm (LYRA, 2019).

Nos preparos sob agitação de 16.000 rpm, com exceção da NEM, todas as demais nanoemulsões apresentaram um aumento no tamanho das partículas em suspensão com relação às velocidades de agitação anteriores. Nesse procedimento, não houve um controle adequado da temperatura das amostras submetidas, o que ocasionou em um aquecimento provocado pela energia cinética liberada no processo de agitação. Tal ocorrido pode ser a explicação para o aumento no tamanho das partículas, uma vez que a elevação na temperatura de uma emulsão é um fator crucial para que o fenômeno de coalescência seja acelerado. Esse fenômeno é um termo empregado quando, em uma emulsão, ocorre coalisão de uma ou mais parcelas de uma fase para a formação de uma única gotícula. Quando há o aumento da temperatura (> 40 °C, aproximadamente), há também o aumento da ocorrência de

Tabela 2. Resultados das caracterizações das emulsões de eugenol (NEE), geraniol (NEG), timol (NET), mentona (NEM) e óleo essencial de gengibre (NEOG). Os tamanhos (z-average, em nm) e os índices de polidispersão (PDI) das partículas são mostrados para cada rotação de emulsificação utilizada. As leituras foram feitas 0 e 24 horas após o preparo das amostras.

AMOSTRA	ROTAÇÕES (rpm)											
	7.000				12.000				16.000			
	0h		24h		0h		24h		0h		24h	
	z-average (nm)	PDI										
NEE	190.2 ^{aB}	0.49 ^{aA}	270.6 ^{aA}	0.90 ^{aB}	131.2 ^{bA}	0.02 ^{bA}	137.5 ^{bA}	0.28 ^{bB}	142.4 ^{cB}	0.10 ^{cA}	274.1 ^{aA}	0.16 ^{cB}
NEG	98.7 ^{aB}	0.17 ^{aA}	150.0 ^{aA}	0.98 ^{aB}	99.4 ^{aB}	0.10 ^{bA}	156.2 ^{aA}	0.13 ^{bB}	113.5 ^{aB}	0.12 ^{bA}	164.8 ^{aA}	0.14 ^{bB}
NET	91.1 ^{bA}	0.06 ^{aA}	91.7 ^{aA}	0.58 ^{aA}	59.8 ^{cA}	0.26 ^{bA}	73.9 ^{bA}	0.14 ^{bB}	152.8 ^{aA}	0.19 ^{cA}	154.3 ^{aA}	0.15 ^{cB}
NEM	299.6 ^{bA}	0.86 ^{bA}	612.7 ^{bA}	0.55 ^{bA}	169.2 ^{cA}	0.94 ^{aA}	325.4 ^{bB}	0.74 ^{aB}	155.0 ^{aA}	0.26 ^{cA}	185.9 ^{aA}	0.35 ^{cB}
NEOG	69.6 ^{bA}	0.65 ^{bA}	74.6 ^{bA}	0.90 ^{bA}	26.7 ^{aA}	0.16 ^{aA}	29.9 ^{aB}	0.45 ^{aB}	107.2 ^{aA}	0.46 ^{cA}	109.8 ^{cA}	0.24 ^{cB}

^{a-c} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente relevantes entre as velocidades de agitação dentro de cada tratamento pelo Teste de Tukey (significância de 0.05)

A-B Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente relevantes entre os tempos 0h e 24h pelo Teste T de Student (significância de 0.05)

choques moleculares entre as partículas e, conseqüentemente, da energia cinética do processo, impactando em seu equilíbrio termodinâmico (FRANZOL & REZENDE, 2015). Além disso, um aumento na temperatura pode reduzir a viscosidade das fases da emulsão, diminuindo a tensão interfacial e a pressão de Laplace, o que conseqüentemente provoca uma redução na energia termodinâmica mínima necessária para que ocorra a produção de nanopartículas (JAFARI *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Marie *et al.* (2002) a produção de emulsões O/A sob alta pressão obteve partículas com diâmetros menores ao resfriar as amostras durante o processo. Para tratamentos com 10% de óleo, houve a redução de 39% do diâmetro das partículas submetidas a resfriamento quando comparadas às que não foram. Além do resfriamento, a coalescência pode ser diminuída através do aumento da viscosidade da amostra, que produzirá um efeito de desaceleração da cinética do processo (RABINOVICH-GUILATT *et al.*, 2004).

A maior parte dos menores tamanhos de partículas foram obtidos na segunda velocidade (12.000 rpm), variando de 26.7 a 29.9 nm para a NEOG e de 59.8 a 73.9 nm para a NET. Essas foram, também, as nanoemulsões com valores de z-average mais estáveis, não apresentando diferenças estatisticamente relevantes nas médias após 24h. Essa maior estabilidade está diretamente relacionada com o tamanho das partículas, uma vez que quanto menores os valores de z-average em uma nanoemulsão, mais estável ela se mostra ao longo do tempo (HUANG; YU; RU, 2010). Um estudo realizado por NOORI *et al.* (2018) apresentou resultados parecidos na produção de nanoemulsões de óleo essencial de gengibre através de métodos de sonicação, atingindo partículas com o tamanho de 57.4 nm. Su & Zhong (2016) realizaram um ensaio em que também foram produzidas nanoemulsões contendo 2% de timol (m/v) através de agitação em Ultra-Turrax durante 2 minutos a 10.000 rpm, obtendo valores de z-average semelhantes ao observado no presente trabalho (de 38.67 a 58.08 nm).

Os maiores diâmetros de partículas foram as dos tratamentos NEE (274.1 nm) e NEM (621.7 nm), nas rotações de 16.000 e 7.000 rpm, respectivamente. Essas também foram as amostras mais instáveis após 24h, com diferenças de valores estatisticamente relevantes. Novamente, o tamanho das partículas apresenta-se intrinsecamente relacionado com a estabilidade da nanoemulsão. Quando as partículas são maiores, há chances de que ocorra a sedimentação durante o armazenamento, juntamente ao fenômeno de coalescência (HUANG; YU; RU, 2010).

Múltiplos estudos com caracterizações de nanoemulsões contendo eugenol demonstraram resultados semelhantes aos valores de z-average encontrados para a NEE. Hu et al. (2016) obteve partículas de 103.6 nm ao produzir nanoemulsões contendo 1.25% de eugenol (v/v) usando-se diferentes técnicas e emulsificantes naturais. Em outro trabalho, Wang & Zhang (2017) produziu nanoemulsões de eugenol (1% v/v) através de métodos de agitação, chegando a valores de z-average de até 158.4 nm de diâmetro. Existem poucos relatos na literatura acerca de nanoemulsões a base de mentona. No entanto, um trabalho realizado por Liang et al. (2012) utilizou o óleo essencial de hortelã-pimenta (rico em mentona) para produzir nanoemulsões através de agitação em Ultra-Turrax por 1 minuto a 24.000 rpm, obtendo nanopartículas na faixa de 200 nm de diâmetro, o que corresponde aos valores encontrados nesse estudo para os tratamentos de NEM. No entanto, todos os resultados demonstram que os tratamentos com eugenol (NEE) e mentona (NEM) são particularmente instáveis, o que impossibilita a sua utilização a longo prazo. Para que isso seja corrigido, são necessários novos ensaios para inclusão de mais agentes emulsificantes e validação de outros métodos de produção de nanoemulsões.

O índice de polidispersão (PDI) apresentou grande distinção entre as nanoemulsões estudadas. Esse índice expressa o quão heterogênea é a distribuição dos tamanhos de partículas em uma emulsão, sendo que valores abaixo de 0.2 indicam que a amostra possui uma distribuição de diâmetros dentro de uma faixa estreita de valores. Valores altos indicam a presença de populações distintas de tamanhos de partícula e alta heterogeneidade da amostra (SOUZA *et al.*, 2012). A análise estatística apontou diferenças relevantes entre os dados obtidos na leitura de 0 e 24h. Isso está relacionado com o fato de que as partículas tendem a se aglomerar e formar precipitados, o que modifica a homogeneidade inicial da amostra (HUANG; YU; RU, 2010).

Como esperado, o PDI possui um comportamento dependente da estabilidade da amostra e o tamanho das partículas: os maiores valores de PDI obtidos foram dos tratamentos NEG (0.98) e NEM (0.94), que também apresentaram maior z-average. Por outro lado, os que apresentaram menor z-average também tiveram PDIs menores e menos variáveis: NET (0.06), NEOG (0.16) e NEE (0.10). Esse resultado coincide com o que foi observado em um estudo realizado por Pongsumpun *et al.* (2020), em que a comparação de dois métodos para obtenção de nanoemulsões de óleo

essencial de canela revelou que a metodologia responsável por obter os menores diâmetros de partículas também produzia os menores valores de PDI.

4.2 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC)

Os resultados para os ensaios de concentração mínima inibitória (MIC) com Xac e Xau-B estão descritos na Tabela 3. A nanoemulsão de timol (NET) foi a que obteve o melhor resultado, com MIC de 0.03% para Xac nas amostras com rotação de 12.000 e 16.000 rpm, e MIC de 0.02% para Xau-B na rotação de 12.000 rpm.

Tabela 3. Resultados para o ensaio de avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xau-B). As concentrações de eugenol (NEE), geraniol (NEG), timol (NET), mentona (NEM) e óleo essencial de gengibre (NEOG) presentes em sua respectiva nanoemulsão são descritas em percentual (v/v), nas três rotações para emulsificação utilizadas (7.000, 12.000 e 16.000 rpm).

AMOSTRA	ROTAÇÃO (rpm)					
	Xac			Xau-B		
	7.000	12.000	16.000	7.000	12.000	16.000
NEE	0.06 %	0.03 %	0.06 %	0.13 %	0.03 %	0.06 %
NEG	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.06 %	0.13 %
NET	0.06 %	0.03 %	0.03 %	0.13 %	0.02 %	0.06 %
NEM	*	*	*	*	*	*
NEOG	*	*	*	*	*	*
Controle negativo		*			*	
Tween 80		*			*	

* Não houve MIC nas maiores concentrações testadas.

Esses valores coincidem com um estudo realizado por Nostro *et al.* (2007), onde testou-se a atividade antimicrobiana de timol, carvacrol e óleo essencial de orégano contra diversas cepas da bactéria *Staphylococcus aureus*, obtendo-se valores de MIC entre 0.03% e 0.06% (v/v). Kotan *et al.* (2007), ao avaliar a atividade de múltiplos compostos naturais contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, também obteve a menor MIC no tratamento utilizando timol. Além disso, alguns estudos envolvendo o uso de óleos essenciais possuindo timol como composto

majoritário já evidenciaram um comportamento antagonista desse composto contra espécies do gênero *Xanthomonas* (GÜLLÜCE *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2019).

A alta atividade antibacteriana de timol já é bem descrita na literatura, mas são poucos os trabalhos relacionando seu potencial contra Xac e Xau-B. Em um trabalho relatado por Dos Santos *et al.* (2019), diversos compostos foram testados contra Xac, e o timol apresentou-se como um dos mais eficientes, com MIC de $0.7 \times 10^3 \mu\text{M}$. Não existem estudos de avaliação da atividade de timol contra Xau-B na literatura, mas os resultados deste trabalho são condizentes com o que foi relatado para outras espécies do gênero *Xanthomonas* (GÜLLÜCE *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2019). Da Silva *et al.* (2019), ao avaliar a viabilidade celular de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* frente à exposição ao timol, relatou danos na membrana citoplasmática que provavelmente estão relacionados com o mecanismo antibacteriano desse composto.

O segundo melhor tratamento foi NEE, com MIC de 0.03% (v/v) na rotação de 12.000 rpm para ambas as bactérias testadas. Um trabalho realizado por Marchese *et al.* (2017) comparou a atividade do eugenol contra diversas cepas bacterianas, encontrando MICs de 0.1 a 0.01% (v/v) contra bactérias Gram-negativas, o que coincide com os resultados do presente estudo. SUER *et al.* 2015, ao testar a atividade anti-Xac de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (contendo 42.7% de eugenol), obteve MIC de 0.43 $\mu\text{L/mL}$. Considerando a porcentagem de eugenol presente no óleo, é esperado que o composto isolado possua uma MIC menor contra Xac, como o ocorrido neste trabalho.

Os tratamentos com geraniol (NEG) foram os que demonstraram menor atividade, com MIC de 0.06% (v/v) em todas as rotações para Xac e nas duas primeiras rotações para Xau-B. Reichling *et al.* (2006) já relatou a atividade antibacteriana de geraniol em concentrações parecidas, com MIC de 0.05% (v/v) para *Escherichia coli* e 0.06% (v/v) para *Staphylococcus aureus*. MIRZAEI-NAJAFGHOLI *et al.* (2017) demonstrou que o geraniol é capaz de inibir o desenvolvimento de Xac a uma concentração de 0.09% (v/v). Assim como para eugenol, não há descrito testes anti-Xau-B utilizando geraniol.

Com exceção dos tratamentos com geraniol, todas as demais nanoemulsões tiveram um aumento na atividade antimicrobiana da rotação de 7.000 rpm para a de 12.000 rpm. Na última rotação (16.000 rpm), ou a MIC se manteve ou teve seu valor aumentado. Esse fenômeno condiz com o que é descrito na literatura. Mutlu-Ingok *et al.* (2020), ao realizar ensaios de atividade antimicrobiana com nanoemulsões de

óleos essenciais com diferentes valores de z-average, obteve uma relação inversa entre o tamanho médio das partículas em suspensão e a ação antibacteriana. Ou seja, quanto menor o valor de z-average, maior a atividade da nanoemulsão. O mesmo foi relatado por Otani *et al.* (2014), em ensaios envolvendo nanoemulsões de cinamaldeído contra *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, e *S. enterica*. Nesse trabalho, os tratamentos com menores tamanhos de partículas apresentaram os maiores halos de inibição.

Tal fenômeno é explicado pelo fato de que as nanopartículas aumentam a superfície de contato da amostra com o microrganismo, melhorando a acessibilidade dos compostos bioativos e sua capacidade de adentrar as membranas celulares (HUANG; YU; RU, 2010). Há estudos, no entanto, que relatam uma baixa influência do tamanho das partículas na ação antimicrobiana, sendo essa mais susceptível aos componentes da nanoemulsão e suas composições. Por isso, nanoemulsões com z-average distintos podem apresentar atividades antimicrobianas parecidas (BURANASUKSOMBAT *et al.*, 2011; TERJUNG *et al.*, 2011). Já existem alguns estudos comprovando a eficácia de nanoemulsões contra espécies do gênero *Xanthomonas*, inclusive utilizando timol como componente bioativo (KUMARI *et al.*, 2018).

Não houve MIC para os tratamentos com mentona (NEM) e óleo essencial de gengibre (NEOG). A mentona foi testada a uma quantidade reduzida, o que pode explicar a ausência de atividade, uma vez que sua ação antimicrobiana já foi relatada em concentrações superiores a 2% (v/v) (JIROVETZ *et al.*, 2009). O óleo essencial de gengibre, por possuir uma composição complexa e variável, pode ter tido sua ação minimizada devido à diluição de seus componentes bioativos. A composição química da amostra usada no estudo também não foi elucidada, o que compromete o entendimento de sua atividade antimicrobiana.

Dentre os três compostos que apresentaram MIC, somente o tratamento com timol (NET) mostrou-se mais eficiente contra Xau-B do que Xac, com concentrações de 0.03% (v/v) para Xac e 0.02% (v/v) para Xau-B na mesma rotação (12.000 rpm). Essa diferença, apesar de não ser muito significativa, pode indicar que esse composto atua de maneiras diferentes para cada espécie. Vale reiterar que estudos demonstram que Xac e Xau-B possuem diferenças na composição proteica da região do periplasma que conferem à elas diferentes espectros de hospedeiros e níveis de patogenicidade, sendo Xac uma espécie mais virulenta que Xau-B (ZANDONADI,

2012). Portanto, tais distinções na morfologia bacteriana podem estar relacionadas com os mecanismos de permeabilidade da membrana através dos quais o timol atua em detrimento à Xac.

Não houve MIC para o tratamento com Tween 80 e nem para o controle negativo.

4.3 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (MBC)

Os resultados para os ensaios de concentração mínima bactericida (MBC) com Xac e Xau-B estão descritos na Tabela 4. Assim como ocorrido com os valores de MIC, os tratamentos que apresentaram mais MBCs foram as nanoemulsões contendo timol (NET), sendo 0.03% para ambas as bactérias na rotação de 12.000 rpm. Não houve MBC para as demais rotações com NET.

Tabela 4. Resultados para o ensaio de avaliação da concentração mínima bactericida (MBC) com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xau-B). As concentrações de eugenol (NEE), geraniol (NEG) e timol (NET) presentes em sua respectiva nanoemulsão são descritas em percentual (v/v), nas três rotações para emulsificação utilizadas (7.000, 12.000 e 16.000 rpm).

AMOSTRA	ROTAÇÃO (rpm)					
	Xac			Xau-B		
	7.000	12.000	16.000	7.000	12.000	16.000
NEE	*	*	*	*	0.03 %	*
NEG	*	*	*	*	*	*
NET	*	0.03 %	*	*	0.03 %	*
Controle negativo		*			*	

* Não houve MBC nas maiores concentrações testadas.

Esses resultados refletem que a atividade inibitória do timol está relacionada com a atividade bactericida, uma vez que tanto os valores de MIC e MBC tiveram concentrações iguais ou muito próximas. Nostro *et al.* (2007), ao avaliar a atividade bactericida de timol frente a espécies do gênero *Staphylococcus*, obteve valores de MBC parecidos, variando de 0.031 a 0.125 % (v/v). No entanto, no presente estudo a ação bactericida só ocorreu nos tratamentos em que o z-average foi menor. Isso coincide com o que foi relatado em um estudo realizado por Sarwar *et al.* (2014), onde a avaliação da atividade bactericida de nanopartículas de quitosana frente a diferentes

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas demonstrou resultados de MBC menores para tratamentos com menores tamanhos de partículas.

Nos tratamentos com eugenol (NEE), apenas a bactéria Xau-B foi susceptível, apresentando a MBC de 0.03% na rotação de 12.000 rpm. Essa diferença no comportamento frente às duas espécies é um fenômeno esperado, uma vez que existem distinções consideráveis na morfologia de cada bactéria que podem influenciar na maneira com que o composto bioativo interage com a membrana celular. Zandonadi *et al.* (2012), ao avaliar o proteoma periplasmático de diferentes cepas de *Xanthomonas* causadoras do cancro cítrico, observou que há distinções nas proteínas presentes nessa região. Assim, ainda que os valores para MIC tenham sido os mesmos, a atividade bactericida do eugenol aparenta possuir mecanismos que se relacionam mais intimamente com Xau-B do que com Xac.

Não houve ação bactericida nas demais rotações, nem para os tratamentos com geraniol (NEG). Essa ausência de atividade pode indicar que a interação dos compostos com a bactéria se dá através de mecanismos bacteriostáticos. Ou seja, ainda que os valores de MIC demonstrem um potencial inibitório, somente concentrações acima das que foram testadas podem ser capazes de matar de fato as células bacterianas. Silva *et al.* (2009), ao avaliar o potencial antimicrobiano de diferentes óleos essenciais contra *S. aureus* e *E. coli*, obteve concentrações de MIC que poderiam ou não ser bactericidas, dependendo da bactéria. Araújo Júnior *et al.* (2013) verificou o mesmo comportamento ao testar óleos essenciais de canela, palmarosa, hortelã e gengibre contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, os quais foram capazes de inibir o desenvolvimento da bactéria mas não tiveram ação bactericida.

5 CONCLUSÃO

Com base no que foi discutido, podemos chegar às seguintes conclusões:

- A atividade antimicrobiana mostrou-se maior na medida em que o tamanho das partículas das nanoemulsões diminuiu. Ou seja, nanoemulsões com z-average menores são mais estáveis e potencializam a bioatividade de compostos naturais;
- Referente a obtenção de menores partículas na velocidade de 16.000 rpm, é necessário o controle de temperatura em ensaios futuros, para que não ocorra a aceleração do processo de coalescência e, conseqüentemente, o aumento dos valores de z-average;
- Dentre os compostos estudados, os que apresentaram melhor eficiência contra as bactérias testadas foram timol (com MICs e MBCs de 0.03 % (v/v) para Xac e Xau-B) e eugenol (com MIC de 0.03 % (v/v) para Xac e 0.02% (v/v) para Xau-B e MBC de 0.03% (v/v) para Xau-B);
- O geraniol, apesar de também ter apresentado concentrações baixas de MIC (0.06% (v/v) para ambas bactérias), não obteve resultados de MBC, o que demanda a necessidade de novos testes empregando-se concentrações mais elevadas do composto;
- A atividade bactericida medida através da MBC indicou que a maior parte dos compostos apresentou uma atividade bacteriostática, sendo que apenas o timol e o eugenol foram capazes de impedir completamente o desenvolvimento das bactérias;
- Xac foi mais susceptível às ações inibitórias dos compostos testados, enquanto Xau-B foi mais susceptível às ações bactericidas;
- Foram obtidos resultados satisfatórios de inibição bacteriana em todas as baixas concentrações utilizadas, o que sugere uma utilização de volumes pequenos desses componentes em possíveis aplicações em larga escala;
- São necessários ensaios futuros para avaliação da toxicidade *in vivo* das nanoemulsões de timol e eugenol para aplicação em citrus.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIKO, J.; MBEGA, E. R.; MORTENSEN, C. N. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 293–306, 2014.
- ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. Some phyto-chemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food Chem Toxicology**, v. 46, p. 409-420. 2008.
- AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília, DF, **EMBRAPA** - Comunicado Técnico, n. 86, 2003.
- AMINI, L.; SOUDI, M. R.; SABOORA, A.; MOBASHERI, H. Effect of essential oil from *Zataria multiflora* on local strains of *Xanthomonas campestris*: An efficient antimicrobial agent for decontaminations of seeds of *Brassica oleracea* var. capitata. **Scientia Horticulturae**. v. 236, p. 256-264. 2018.
- AMORIM, E. P. R.; ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. S.; SILVA, J. C.; LIMA, R. S.; LEMOS, E. E. P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33. 2011.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods b using essential oils: a review. **Food Research International**, v.45, p. 722-734. 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 , p.446-475. 2008.
- BALTA, I.; BRINZAN, L.. STRATAKOS, A. C.; LINTON, M.; KELLY, C.; PINKERTON, L.; CORCIONIVOSCHI, N. Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 74. 2017.
- BARBOSA, M. S. Atividade biológica in vitro de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 2, p. 254-261. 2015.
- BARD, M.; ALBRECHT, M. R.; GRUPTA, N.; GUYNN, C. J.; STILLWELL, W. Geraniol interferences with membrana functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v. 23, n. 6, p. 534-538. 1988.
- BAYDAR, H.; BAYDAR, N. G. The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 251-255. 2005.
- BEHLAU F.; FONSECA, E. A., BELASQUE, J. Jr. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, v. 65, p. 1390–1399, 2016.
- BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. 2020.

BEHLAU, F.; BELASQUE Jr., J. Cancro cítrico: a doença e seu controle, 1 ed. **Fundecitrus**, 2014. 94 p.

BEHLAU, F.; BELASQUE JUNIOR, J. Ciclo da doença e epidemiologia. Cancro cítrico: a doença e seu controle. **Fundecitrus**, Araraquara, SP, p.20-28. 2014.

BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B. Cancro cítrico: medidas essenciais de controle. 3 ed. **Fundecitrus - Fundo de Defesa da Agricultura**, Araraquara, 2017. 24 p.

BERK, Z. Citrus Fruit Processing. Academic Press, **Elsevier**. 2016.

BERNE, B. J.; PÉCORA, R. Dynamics Light Scattering, **Dover Pub**. 2000.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**. Florida, USA, v. 4, n. 3, p. 141-157. 2003.

BURANASUKSOMBAT, U.; KWON, Y. J.; TURNER, M.; BHANDARI, B. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, p. 793-800. 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253. 2004.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 34, p. 107-133, 2010.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119. 2015.

CARNIELLI, C. M.; ARTIER, J.; OLIVEIRA, J. C. F.; NOVO-MANSUR, M. T. M. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* surface proteome by 2D-DIGE: Ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction. **Journal of Proteomics**, v. 515, p. 251-263. 2017.

CARVALHO, A. F.; MELO, V. M.; CRAVEIRO, A. A; MACHADO, M. I.; BANTIM, M. B; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, p.569-571. 2003.

CARVALHO, S. A.; GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; FERRAREZI, R. S.; COLETTA FILHO, H. D. Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41. 2019.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 643-651. 2010.

CitrusBR 2019. Embarques brasileiros de suco de laranja têm alta de 54%. Disponível em <<http://www.citrusbr.com/destaques/?id=312802>>. Acesso em 22 de março de 2020.

CONNELL, S.; LI, J.; SHI, R. Synergistic bacterial activity between hyperosmotic stress and membrane-disrupting nanoemulsions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 69-77. 2013.

COSTA, S. M.; LEMOS, T. L.; PESSOA, O. D.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **J Nat Prod**, v.64, p. 792-795. 2001.

COUTINHO, H. D. M.; FREITAS, M. A.; GONDIM, C. N. F. L.; ALBUQUERQUE, R. S.; FERREIRA, J. V. A.; ANDRADE, J. C. In vitro antimicrobial activity of Geraniol and Cariophyllene against *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, p. 98-105. 2015.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-176. 2000.

CRUZ, M. M.; LINS, S. R. O. L.; OLIVEIRA, S. M. A. O.; BARBOSA, M. A. G. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, cv. Kent. **Revista Caatinga**, v. 25, p. 1-6. 2012.

DA SILVA, R. S.; OLIVEIRA, M. M. G.; 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.

DABAGUE, I. C. M. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 79-84. 2011.

DAS, A. K. Citrus Canker. A review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p.52-60, 2003.

DAUNGFU, O.; YOUNPENSUK, S.; LAMYONG, S. Endophytic Bacteria Isolated from Citrus Plants for Biological Control of Citrus Canker Lime Plants. **Tropical Life Sciences Research**, v. 30, p. 73-88. 2019.

DEBBARMA, J.; KISHORE, P.; NAYAK, B; B.; KANNUCHAMY, N.; GUDIPATI, V. Antibacterial activity of ginger, eucalyptus and sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria. **J Food Process Pres**, v. 37, p. 1022-1030. 2013.

DESWAL, DP.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 23, p. 409-417. 1997.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 69, p. 25-28. 1994.

DONADIO, L. C., MOURÃO FILHO, F. A. A., MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. Citros, Campinas: **Instituto Agrônomo e Fundag**, p.1-18. 2005.

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT: Food Sci. Technol.**, v. 44, p. 1908-1914. 2011.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120. 2016.

DOPSON, R.N. The eradication of citrus canker. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 30–31, 1964.

DU PLOOY, W.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, p. 117-122. 2009.

DUGO, G.; GIACOMO, A. D. Citrus. The Genus Citrus. **Environment & Agriculture, Food Science & Technology**, ed. 1. 2002.

DUHAN, J. S.; KUMAR, R.; KUMAR, N.; KAUR, P.; NEHRA, K.; DUHAN, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 11-23. 2017.

Embrapa, 2019. **Plano estratégico da equipe técnica de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura 2017-2021**. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197058/1/Documento230-MarcioCanto-WalterSoares-Ainfo.pdf>>. Acesso em 21 de março de 2020

FADEL, A. L.; FILHO, F. A. A. M.; STUCHI, E. S.; WULFF, N. A.; COUTO, H. T. Z. Citrus sudden death-associated virus (CSDaV) and citrus tristeza virus (CTV) in eleven rootstocks for "Valencia" sweet orange. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2017.

FALCONE, P.; SPERANZA, B.; DEL NOBILE, M. A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. A Study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intendend as a Natural Preservative. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 8, p. 1664-1670. 2005.

FAWCETT, H. S. Citrus diseases and their control. **New York: Mc. Graw-Hill**, 1936. 656 p.

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology, St. Paul**, v. 23, p. 820-824. 1933.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: H.Kimati, L.Amorim, A.Bergamin Filho, L.E.A.Camargo, J.A.M.Rezende. (Org.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 3ed.São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres Ltda., v. 2, p. 261-296. 1997,.

FERNANDES, B. C. Desenvolvimento histórico da citricultura. **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Economia. 2010.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloid. Surface A**, v. 251, p. 53-58. 2004.

FERREIRA, J. V. N.; CAPELLO, T. M.; SIQUEIRA, L. J. A.; LAGO, J. H. G.; CASELI, L. Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation. **Langmuir**. 2016.

FIGUEIREDO, M. G.; BARROS, A. L. M.; FRIZZONE, J. A.; JUNIOR, J. B. Dano econômico evitado pelo controle de doenças na citricultura paulista. **Sociedade Brasileira de Economia**, Administração e Sociologia Rural. 2009.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. C.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.** v. 18. 2011.

Food and Agriculture Organization – FAO. (2016). **Faostat: production**. Disponível em < <http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 de março 2020.

FRACETO, L. F.; GRILLO, R.; DEMEDEIROS, G. A.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? **Front. Environ. Sci**, v. 4. 2016.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25. 2015.

Fundecitrus 2020. Cancro cítrico cresce 15% em relação a 2019 e incidência de CVC se mantém baixa. Disponível em <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/cancro-citrico-cresce-15-em-relacao-a-2019-e-incidencia-de-cvc-se-mantem-baixa/943>>. Acesso em 17 de agosto de 2020.

FURMAN, N.; KOBAYASHI, K.; ZANEK, M. C.; CALCAGNO, J.; GARCIA, M. L.; MENTABERRY, A. Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. **Journal of Biotechnology**, v. 167, p. 412-419, 2013.

GANIYU, S. A.; POPOOLA, A. R.; AGBOLADE, J. O.; ENIKUOMEHIN, O. A. Thymol and acibenzolar-s-methyl reduce incidence and severity of bacterial wilt of tomato caused by race I biovar III (R1B3) strain of *Ralstonia solanacearum* in Nigeria. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 58. 2018.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. B.; POLIDO, P. B.; SOUZA, S. G. H.; DO VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arq. Ciên. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-131. 2012.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 338-344. 2013.

GOGOS, A.; KNAUER, K.; BUCHELI, T. D. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 60, p. 9781-9792. 2012.

GOTO, M.; TAKAHASHI, T.; MESSINA, M. A. A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancrrosis B in Argentina. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 46, p. 329-338, 1980.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by HLB. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, p. 311-326. 1949.

GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and cavacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144-150. 2011.

GÜLLÜCE, M.; SÖKMEN, M.; DAFERERA, D.; AGAR, G.; ÖZKAN, H.; KARTAL, N.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; SAHIN, F. In-vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 3958-3965. 2003.

HU, Q.; GERNARD, H.; UPADHYAYA, I.; VENKITANARAYANAN, K.; LUO, Y. Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2016.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1. 2010.

HUANG, S.; WANG, L.; LIU, L.; HOU, Y.; LI, L. Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review. **Agron. Sustain. Dev.**, v. 35, p. 369-400. 2015.

Centro de Citricultura, n. 299/300/301. 2020. Disponível em <http://ccsm.br/wp-content/uploads/2020/08/INFORMATIVO_CCASM_4-5-6_2020.pdf>. Acesso em 19 de outubro de 2020.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1191-1202. 2008.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.; ZU, Y.; LIU, X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 63-68. 2011.

JIVORETZ, L.; BACHBAUER, G.; BAIL, S.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; STOYANONA, A.; SCHMIDT, E.; GEISLER, M. Antimicrobial Activities of Essential Oils of Mint and Peppermint as Well as Some of Their Main Compounds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 363-366. 2009.

JÚNIOR ARAÚJO, J. M.; OLIVEIRA, W. J.; LIMA, M. A. G.; CARVALHO, F. C. Q.; MARIANO, R. R. L.; SOUZA, E. B. Efeito de óleos essenciais no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão - JEPEX 2013 - UFRPE**. 2012.

JUNIOR, J. B.; FILHO, A. B.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMANOTO, P. T. et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 137-145. 2009.

KAH, M. Nanopesticides and nanofertilizers: emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? **Front. Chem.**, v. 3, p. 1-6. 2015.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Sys Rev Pharm.**, v. 8, p. 39-47. 2017.

KIM, J. M.; MARSHALL, M. R.; CORNELL, J. A.; PRESTON III, J. F.; WEI, C. I. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. **Journal of Food Science**, v. 60. 1995.

KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 213-250, 1980.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, p. 21-43. 2012.

KOTAN, R.; DADASOGLU, F.; KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; DIKBAS, N.; ÇAKMAKÇI, R. Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. **Journal of Agricultural Technology**, p. 299-306. 2007.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640. 2004.

KULSHRESTHA, S.; CHATURVEDI, S.; JARGIR, R.; AGRAWAL, K. *In vitro* Evaluation of Antibacterial Activity of Some Plant Leaf Extracts against *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Isolated from Seeds of Lentil (*Lens culinaris* Medik.). **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 59-64. 2015.

KUMARI, S.; KUMARASWAMY, R. V.; CHOUDHARY, R. C.; SHARMA, S. S.; PAL, A.; RAMESH, R.; BISWAS, P.; SAHARAN, V. Thymol nanoemulsion exhibits potential antibacterial activity against bacterial pustule disease and growth promotory effect on soybean. **Scientific Reports**, n. 6650. 2018.

LAMICHLANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J. B.; AUBERTOT, J. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38. 2018.

LI, M.; MUTHAIAN, A.; O'BRYAN, C. A.; GUSTAFSON, J. E.; LI, Y.; CRANDALL, P. G. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1240-1254. 2011.

LIANG, R.; XU, S.; SHOEMAKER, C. F.; LI, Y.; ZHONG, F.; HUANG, Q. Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. **American Chemical Society**, v. 60, p. 7548-7555. 2012.

LIRA, M. H. P.; ANDRADE JUNIOR, F. P.; MORAES, G. F. Q.; MACENA, G. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. G. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. **Journal of Essential Oil Research**. 2020.

LYRA, L. P. S. Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. 2019.

MABONA, U.; VILJOEN, A.; SHIKANGA, E.; MARSTON, A.; VUUREN, S. V. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of bioactive compound. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; CARVALHO, M. L. V.; RODRIGUES NETO, J.; ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E. M. C.; PALAZZO, D. A. Reaction of different Citrus and relatives to bacterial canker C [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]. **Proceedings Congress of the International Society of Citriculture**. v. 1, p. 363-364, 1987.

MALVERN PALANYTICAL. **Zetasizer Nano ZS**. Disponível em <Zetasizer Nano ZS | Tamanho da proteína, Potencial zeta, Mobilidade da proteína - Suporte de produto| Malvern Panalytical>. Acesso em 3 de dezembro de 2020.

MANYAM, P.; NARGUND, V. B. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* isolates, the causal agent of citrus canker by pathogenicity and PCT based methods. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, p. 173-176, 2020.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; IZADI, M.; ABDOLLAHI, M.; NABAVI, S. M.; AJAMI, M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**. 2017.

MAREI, G. I.; RASOUL, M. A. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 56-61. 2012.

MARIE, P.; PERRIER-CORNET, J. M.; GERVAIS, P. Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. **Journal of Food Engineering**, v. 53, p. 43-51. 2002.

MARTÍNEZ, C. A. G. Principais componentes do óleo essencial de acessos de *Mentha* spp em Brasília e estudo da propagação vegetativa. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2016.

MARTINS, C. M. Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Pau-Santo)

do cerrado. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química. 2012.

MEMAR, M. Y.; RAEI, P.; ALIZADEH, N.; AKBARI AGHDAM, M.; KAFIL, H. S. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 28, p. 63-38. 2017.

MENDES, B. M. J.; CARDOSO, S. C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRUZ, R. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic Citrus sinensis expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, v. 59, p. 68-75, 2010.

MENDONÇA, L. B. P.; ZAMBOLIM, L.; BADEL, J. L. Bacterial Citrus Diseases: Major Threats and Recent Progress. **Journal of Bacteriology & Micology**, v. 5. 2017.

MIRZAEI-NAJAFGHOLI, H.; TARIGHI, S.; GOLMOHAMMADI, M.; TAHERI, P. The effect of Citrus essential oils and their constituents on growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Molecules**, v. 22. 2017.

MIRZAEI-NAJAFGHOLI, H.; TARIGHI, S.; GOLMOHAMMADI, M.; TAHERI, P. Screening of antibacterial activity of three plant essential oils and its components against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress**, p. 343. 2016.

MOGHIMI, R.; GHADERI, L.; RAFATI, H.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D. K. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, v. 15. 2015.

MOORE, G. A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 536-540. 2001.

MOREIRA L. M.; SOUZA, R. F. de; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annuals Reviews Phytopathology**. Virginia, USA, v. 42, p. 163-184. 2004.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA JR, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L.; ADI, S. S. et al. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v. 11. 2010.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S.; VAJNOV, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, p. 223-231. 2006.

MÜHLDORFER, I; SCHÄFER, K. P. Emerging Bacterial Pathogens. **Karger**, Alemanha. v. 8, 2001.

MUTLU-INGOK, A.; FIRTIN, B.; KARBANCIUGLU-GULER, F.; ALTAY, F. A study on correlations between antimicrobial effects and diffusion coefficient, zeta potential and droplet size of essential oils. **International Journal of Food Engineering**. 2020.

NAMEKATA, T. O cancro cítrico. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.P.; AMARO, A.A. (Ed.). Citricultura Brasileira. Campinas: **Fundação Cargill**, 2. ed. v. 2, p. 775- 786, 991.

NAZZARO, F.; FRANTIANNI, F.; DE MARTINO, L. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, p. 1451-1474. 2013.

NEJAD, L. R.; MILANI, M. A.; AFSHAR, P. G. Evaluation of Composition and Antimicrobial Properties of *Mentha piperita* L. Leaf Powder in Italian Salad Dressing. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 5, p. 151-156. 2015.

NERO, E. F. Revisão Literária sobre cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, n. 10, p. 1-7, 2006.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da Citricultura 2017**. CitrusBr, ed. 1. 2017.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; KALAKI, R. B. Peeling back the citrus in Brazil: mapping and quantification of the brazilian citrus chain. **Citrus Research & Technology**, v. 35, p. 45-60. 2014.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia**. 2010.

NICÁCIO, G. L.; MOURA, S. C.; COSTA, J. V. J.; SENA, C. R.; CRUZ, T. B. F. C.; LOPES, G. N. M.; CECÍLIO, A. B. Breve revisão sobre as propriedades fitoterápicas do *Zingiber officinale* Roscoe - O Gengibre. **Sinapse Múltipla**, v. 7, p. 74-80. 2018.

NICULAU, E. S.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MARTINS, C. H. G.; FORIM, M. R.; MACHADO, M. A. Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos aromáticos frente à *X. citri* subsp. *citri*, bactéria causadora do cancro cítrico. **Anais do 59º Congresso Brasileiro de Química**. 2019.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J. Agressividade de Linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C em Lima Ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, p. 140-146, 2006.

NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, n. 84, p. 321-320. 2018.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 191-195. 2004.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 519-523. 2007.

OLIVEIRA, J. G.; ABREU FILHO, B. A. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2. 2012.

OLIVEIRA, R. P.; UENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C.; ROCHA, P. S. G. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. **Embrapa Clima Temperado. Documentos**, 234. 2008.

OTONI, C. G.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M. V.; SOARES, N. F. F.; MATTOSO, L. H. C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**. 2014.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; BARBOSA, C. J.; CUNHA SOBRINHO, A. P. Clones de laranja 'DE RUSSAS'. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2013. 4p.

PERDONES, A.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, L.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 70, p. 32-41. 2012.

PEREIRA, M. A. Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica. Programa de Pós Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, **Dissertação de Mestrado**. 2010.

PEREIRA, M. M.; RAPOSO, N. R.; BRAYNER, R.; TEIXEIRA, E. M.; OLIVEIRA, V.; QUINTAO, C. C.; CAMARGO, L. S.; MATTOSO, L. H.; BRANDAO, H. M. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. **Nanotechnology**, v. 24. 2013.

PEREIRA, T. A. Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2011.

PONGSUMPUN, P.; IWAMOTO, S.; SIRIPATRAWAN, U. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 60. 2020.

POOLAR, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific PCR Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Strains Causing Citrus Variegated Chlorosis. **Current Microbiology**, v. 31, p. 377-381. 1995.

POZZO, M. D.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, p. 667-672. 2011.

PRUVOST, O.; ROBENE, I.; ESCALON, A.; LEDUC, A. The dynamic world of the genus *Xanthomonas*. In: Wang N, Jones JB, Sundin GW, White FF, eds. Virulence

mechanisms of plant pathogenic bacteria. Saint Paul, Minnesota, USA: **The American Phytopathological Society**, p. 381-385. ISBN 978-0-89054-444-0, 2015.

RABINOVICH-GUILATT, L.; COUVREUR, P.; LAMBERT, G.; GOLDSTEIN, D.; BENITA, S.; DUBERNET, C. Extensive surface studies help to analyze zeta potencial data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, p. 1-13. 2004.

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, p. 287-293. 2012.

RAJAESWARA RAO, B. R.; BHATTACHARYA, A. K.; MALLAVARAPU, G. R.; RAMESH, S. Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 344-350. 2004.

REICHLING, J.; SUSCHKE, U.; SCHNEELE, J.; GEISS, H. K. Antibacterial Activity and Irritation Potential of Selected Essential Oil Componentes - Structure-Activity Relationship. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 1003-1012. 2006.

RIBEIRO, T. P.; LIMA, M. A. C.; TRINDADE, D. C. G.; SANTOS, A. N.; AMARIZ, A. Uso de revestimentos à base de destrina na conservação pós-colheita de manga "Tommy Atkins". **Rev. Bras. Frutic.**, v. 31, n. 2, p. 343-351. 2009.

RICHARD, D.; BOYER, C.; VERNIÈRE, C.; CANTEROS, B. I.; LEFEUVRE, P.; PRUVOST, O. Complete Genome Sequences of Six Copper-Resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Strains Causing Asiatic Citrus Canker, Obtained Using Long-Read Technology. **Genome Announcements**, v. 5. 2017.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Ethnopharmacol**, v. 22, p. 80-84. 2005.

ROSSETTI, V.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. **Fundação Cargill**, Campinas, 1993. 84 p.

RÚA, J.; DEL VALLE, P.; ARRIAGA, D.; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, L.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2019.

RYAN, R. P.; VORHOLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M. A. V.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews**, v. 9, p. 344-355, 2011.

SAA São Paulo. **Coordenadoria da Defesa Agropecuária**. Cancro Cítrico. Disponível em <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/programas/?/sanidade-vegetal/cancro-citrico/&cod=25#:~:text=Algumas%20das%20medidas%20de%20controle,de%20bins%20nos%20limites%20da>>. Acesso em 14 de setembro de 2020.

SAMUELSSON, G. *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*. Stockholm, **Swedish Pharmaceutical Press**, 1999.

SANTISTEBAN, A. R. N. Caracterização funcional do mutante da orf XAC1008 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal. 2015.

SANTOS, C. F. O cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu controle. *Citricultura Brasileira*. **Fundação Cargill**, Campinas, p. 787–823, 1991.

SARTO, M. P. M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revesita UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, p. 98-102. 2014.

SARWAR, A.; KATAS, H.; ZIN, N. M. Antibacterial effects of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. **J Nanopart Res**, v. 16. 2014.

SAUER, A. V.; SANTOS, E. M.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; NOCCHI, P. T. R.; NUNES, W. M. C.; BONATO, C. M. Bacteriostatic and Bactericidal Activity In Vitro of Different Essential Oils as Alternative Treatments to Control *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Proc. XII Intl. Citrus Congress**, p. 931-936. 2015.

SCHAAD, N. W. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 690-695, 2006.

SCHUBERT, T. S.; SUN, C. Bacterial Citrus Canker. **Plant Pathology Circular**, v. 377. 1996.

SCOTT, N. R.; CHEN, H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **Ind. Biotechnol.**, v. 9. p. 17-18. 2013.

SERVIN, A.; ELMER, W.; MUKHERJEE, A.; DE LA TORRE-ROCHE, R.; HAMDI, H.; WHITE, J. C.; BINDRABAN, P.; DIMKPA, C. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. **J. Nanopart. Res.**, v. 17. 2015.

SIMÕES, C. M. O., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS, 1999.

SINGH, A.; GUPTA, R.; TANDON, S.; PANDEY, R. Thyme Oil Reduces Biofilm Formation and Impairs Virulence of *Xanthomonas oryzae*. **Frontiers in Microbiology: Plant Pathogen Interactions**. 2017.

SINGH, G.; KAPPOR, I. P. S.; PRATIBHA, S.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oils and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food Chem**, v. 46, p. 3295-3302. 2008.

SINGH, G.; MAURYA, S.; CATALAN, C.; LAMPASONA, M. P. Studies on essential oils, Part 42: chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. **Favlor Fragr J**, v. 20, p. 1-6. 2005.

SMITH, C. J.; SHAW, B. J.; HANDV, R. D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquat Toxicol**, v. 82, p. 94-109. 2007.

SOARES, L. S.; NOCCHI, P. T. R.; FRANCO, J. G.; NANAMI, D. S. Y.; SILVA, C. C.; NUNES, W. M. C. Avaliação de diferentes meios de cultura no cultivo de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **IX EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar**. 2015.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Curr. Opin Colloid In.**, v. 10, p. 102-110. 2005.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. M.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1. 2012.

SU, D.; ZHONG, Q. Formation of thymol nanoemulsions with combinations of casein hydrolysates and sucrose stearate. **Journal of Food Engineering**, v. 179, p. 1-10. 2016.

SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. **Xanthomonas**. Chapman & Hall, London. 1993.

TERJUNG, N.; LÖFFLER, M.; GIBIS, M.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. **Food & Function**. 2011.

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J.H. Compendium of citrus diseases. 2. ed. St. Paul: The American **Phytopathological Society**, 2000. 92 p.

TREVISAN, S. C. C.; MENEZES, A. P. P.; BARBALHO, S. M.; GUIGUER, E. L. Properties of *Mentha piperita*: a brief review. **World Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, p. 309-313. 2017.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action on Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 49, p. 2474-2478. 2005.

USDA 2020. Citrus: **World Markets and Trade**. Disponível em <<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/00000g55g/kp78h0193/citrus.pdf>>. Acesso em 22 de março de 2020.

VALENTE, J. S. S.; FONSECA, A. O. S.; DENARDI, L. B.; DAL BEN, V. S.; FILHO, F. S. M.; BAPTISTA, C. T.; BRAGA, C. Q.; ZAMBRANO, C. G.; ALVES, S. H.; BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B. In Vitro Susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* Essential Oils Combinations. **Mycopathologia**, v. 181, p. 617-622. 2016.

VIEIRA, F. C. F. Anatomia e ultraestrutura do processo de infecção de *Xanthomonas* causadoras de doenças em citros. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2018.

WANG, K.; JIANG, S.; PU, T.; FAN, L.; SU, F.; YE, M. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. **Natural Product Research**, 2018.

WANG, L.; ZHANG, Y. Eugenol Nanoemulsion Stabilized with Zein and Sodium Caseinate by Self-Assembly. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2017.

WENDAHOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. **Food Protect**, v. 56, p. 410-413. 1993.

WOHLMUTH, H. Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1414–1419. 2006.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174-179. 2008.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. G.; GRESPAN, R.; KOHIYAMA, C. Y.; FERREIRA, F. D.; MOSSINI, S. A. G.; SILVA, E. L.; ABREU-FILHO, B. A.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI JUNIOR, M. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chem**, v. 141, p. 3147-3152. 2013.

ZAMUNER, C. F. C. Potencial de ação de compostos como protetivos e sanitizantes contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causador do cancro cítrico. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2019.

ZANDONADI, F. S. Análise proteômica diferencial da fração periplasmática das estirpes A, B e C de *Xanthomonas* spp. que diferem na patogenicidade e espectro de citros hospedeiros. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução. 2012.

ZHANG, J.; MA, S.; DU, S.; CHEN, S.; SUN, H. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 2611-2620. 2019.

ZHANG, M.; GE, J.; YU, X. Transcriptome Analysis Reveals the Mechanism of Fungicidal of Thymol Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Current Microbiology**, v. 75, p. 410-419. 2018.

ZHENG, Y.; ZHENG, M.; MA, Z.; XIN, B.; GUO, R.; XU, X. Sugar Fatty Acid Esters. **Polar Lipids**, p. 215-243. 2015.