
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVAS NO CONTROLE DO CANCRO
CÍTRICO**

VÍTOR RODRIGUES MARIN



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ALTERNATIVAS NO CONTROLE DO CANCRO
CÍTRICO**

VÍTOR RODRIGUES MARIN

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Dra. Daiane Cristina Sass

**Rio Claro – SP
2023**

M337o Marin, Vítor Rodrigues
Óleos essenciais como alternativas no controle do cancro cítrico /
Vítor Rodrigues Marin. -- Rio Claro, 2023
188 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. fitossanidade. 2. controle biológico. 3. biopesticidas. 4.
xanthomonas. 5. microbiologia agrícola. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Óleos essenciais como alternativas no controle do Câncer cístico

AUTOR: VÍTOR RODRIGUES MARIN

ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP - IB de Rio Claro

Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Prof. Dr. GUILHERME DILARRI (Participação Virtual) 
Departamento de Engenharia de Pesca e Ciências Biológicas / Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Profa. Dra. SIMONE DA COSTA MELLO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / ESALQ - USP

Rio Claro, 29 de novembro de 2023

Agradecimentos

Aos meu pais Ângelo e Marta, e minha irmã Thais, pela educação e carinho, por estarem sempre presentes e acreditarem que a jornada vale a pena;

À Profa. Dra. Daiane Cristina Sass, minha orientadora, pelo espaço e tempo cedidos ao longo desses seis anos, pelo trabalho realizado, pela atenção e conselhos as vezes além da vida acadêmica, pela amizade e parceria;

À Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis, minha coorientadora, pela assistência e tempo cedido durante a realização do trabalho;

Aos meus companheiros do Laboratório de Química e Biotecnologia de Microrganismos: Gabrielle, Juliano, Lucas, Eduarda, Vitória, Ana, Maria, Caroline, Ângelo e Isabela, pelo tempo compartilhado, trabalho e amizades ao longo desses seis anos;

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira, pelo espaço cedido em seu laboratório, parceria e assistência na realização do trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Genética de Bactérias: Caio, Giovane, Natalia, Mario, Guilherme, Igor, Giovana, pela amizade, assistência e parceria na realização do trabalho.

Aos meus amigos, Caio, Carolina, Matheus, Juliana, Marina, Fernando, Thiago, Rafaela, Karina, Felipe, Marina Abreu e tanto outros que compartilharam risadas, lágrimas, dias, noites, experiências boas e ruins.

Ao Prof. Dr. Ben-Hur Mattiuz, pelos conselhos e auxílio no desenvolvimento da etapa final do trabalho.

A empresa Andrade SunFarms, nas pessoas de Aline Andrade, proprietária, e Dra. Renata Imperato, representante científica, pelas portas abertas, suporte e auxílio na realização do projeto.

A equipe técnica do Depto. de Biologia Geral e Aplicada, antigo Depto. de Bioquímica e Microbiologia: Adriano, Carmen, Fátima, pela sempre pronta ajuda durante a realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitaram a dedicação integral ao programa de pós-graduação e a execução do projeto;

A todos que estiveram presentes nesta etapa de minha vida.

“I’d take the awe of understanding over the awe of ignorance any day.”

-Douglas Adams

Resumo

Desde que os seres humanos praticam agricultura, fitopatógenos têm sido um obstáculo na produção de alimentos. Esses patógenos podem reduzir o montante de alimento produzido mundialmente, fazendo com que produtores se dependam de pesticidas tradicionais, tornando estes, um dos pilares da agricultura moderna. Ainda que efetivos, seu uso contínuo pode levar a efeitos adversos. Trabalhadores rurais e produtores, expostos regularmente a esses produtos, podem desenvolver condições de saúde severas, e descobertas mais recentes descrevem os riscos para os consumidores finais. Ainda, os impactos ambientais são inegáveis, com acumulação de químicos no solo, corpos d'água e pela cadeia alimentar. Adicionalmente, seu uso recorrente pode levar ao surgimento de resistência microbiana, pressionando produtores a usarem maiores quantidades de pesticidas. Neste contexto, mudanças recentes na percepção do público sobre os riscos dos pesticidas levaram a busca por soluções mais “verdes”. Portanto, a busca por produtos eficientes e sustentáveis passa pela diversidade dos produtos naturais como ingredientes ativos. Esse documento descreve o uso de óleos essenciais (OEs) como ativos no controle da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), uma praga quarentenária e causador conhecido do cancro cítrico (CC). CC pode afetar tanto a quantidade, devido à queda prematura, quanto a qualidade dos frutos em função do surgimento de lesões que depreciam seu valor e limitam as opções de comercialização. O **Capítulo 1** compreende uma sucinta revisão sistemática sobre OEs como agentes no controle de fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Foram elaboradas buscas com palavras chaves na plataforma *Scopus* rendendo 132 trabalhos publicados, sendo reduzidos a 93 após as etapas de seleção. Os artigos foram analisados e informações como espécie vegetal que origina o OE, fitopatógeno, método de análise *in vitro* e as concentrações inibitórias provenientes foram coletadas. Os resultados obtidos indicaram que fitopatógenos fúngicos são os mais

comumente estudados, especialmente gêneros com *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Alternaria*, e as espécies vegetais dos gêneros *Origanum*, *Thymus*, *Cymbopogon* e *Mentha* são as fontes de OEs mais comumente estudadas. O **Capítulo 2** descreve o desenvolvimento de formulações compostas pelos OEs para a sanitização de limas ácidas do tipo “Tahiti” contaminadas por *X. citri*, uma etapa requerida na produção de citros devido a barreiras sanitárias impostas para impedir a disseminação da doença. Ensaios *in vitro* iniciais revelaram que os OEs de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) apresentaram as menores concentrações inibitórias (0.03% (v/v)) e foram selecionados para desenvolvimento das formulações. Os tratamentos das limas ácidas contaminadas artificialmente com células de *X. citri* revelaram que as formulações contendo OE de orégano à 1% (v/v) e capim-limão à 2% (v/v) foram capazes de remover células viáveis da bactéria sem alterar as características visuais dos frutos após durante o período de armazenagem. O **Capítulo 3** é referente a um artigo já publicado que relata um estudo aprofundado sobre OE de *O. vulgare* e seus principais componentes, os monoterpenos isoméricos: timol e carvacrol. Ambos apresentaram atividade antibacteriana em concentrações similares (100 e 114 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e tem a membrana bacteriana como seu principal alvo celular. Porém, ensaios em mudas de citros revelaram ação distinta entre os compostos. Tanto o timol, quanto o OE de *O. vulgare*, composto majoritariamente por carvacrol, foram capazes de reduzir o surgimento de lesões de CC, enquanto o carvacrol apresentou efeito não significativo, indicando uma possível ação sinérgica entre os compostos e os demais componentes do OE. Finalmente, o **Capítulo 4** descreve as diferenças entre os OEs de quatro espécies do gênero *Cymbopogon* (*C. martini*, *C. schoenanthus*, *C. citratus*, *C. winterianus*) em relação a sua atividade antibacteriana contra *X. citri*, e sua composição. Os OEs avaliados apresentaram concentrações inibitórias que variaram entre 139 e 301 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e tiveram como principal alvo a membrana celular bacteriana. Os OEs de *C.*

martinii e *C. schoenanthus* também foram capazes de reduzir o número de células viáveis de *X. citri* da superfície de limas ácidas do tipo “Tahiti” quando preparados em soluções aquosas, revelando seu potencial para aplicação no processamento de frutos cítricos.

Palavras-chave: Produtos naturais; fitopatógenos; biopesticidas; *Xanthomonas*

Abstract

As long as humans practice agriculture, phytopathogens have been an obstacle to food production. These pathogens can reduce the amounts of food produced worldwide, making producers rely on traditional pesticides, turning these products into one of the pillars of modern agriculture production chain. While effective, the continuous use of these chemicals may lead to adverse effects. Farmers and producers, more regularly exposed to these chemicals, can develop severe health conditions, and more recent findings describe the risks for consumers. Moreover, the environmental impacts are undeniable, with chemicals accumulating in the soil, water bodies, and along the food chain. In addition, its recurrent use leads to the emergence of microbial resistance, pressuring farmers to use larger quantities of pesticides. In this light, recent changes in perception about the risks of pesticides led to the search for “greener” choices. Therefore, the search for efficient and sustainable pesticides passes through the diversity of natural active ingredients. This document describes the use of essential oils (EOs) as active substances in the control of the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), a quarentenary disease and known causer of citrus canker (CC). CC can affect both the quantity, due to premature drop, and quality of citrus fruit due to the emergence of lesions that depreciate fruit value and limit commercialization options for producers. **Chapter 1** comprises a succinct systematic review of articles relating EOs as control agents for fungal and bacterial phytopathogens. Searches were made in the *Scopus* database though the use of keywords, resulting in 132 published works, reduced to 93 after selection step. The papers were analyzed and information such as plant species from where the EO was obtained, phytopathogens, *in vitro* techniques and inhibitory concentrations were extracted. The results indicate that fungal phytopathogens are more commonly studied, specially from genus like *Fusarium*, *Colletotrichum* and *Alternaria*, and the EOs from *Origanum*, *Thymus*, *Cymbopogon*

and *Mentha* are the most studied genus. **Chapter 2** describes the development of two formulations containing EOs for sanitization of acid limes of the “Tahiti” variety contaminated with *X. citri*, a required process in citrus fruit production due to sanitary regulations imposed by agencies to prevent disease spreading. *In vitro* assays revealed that the EOs of oregano (*Origanum vulgare*) and lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) presented the lowest inhibitory concentration (0.03% (v/v)) and were selected for formulation development. The treatments of acid limes artificially contaminated by *X. citri* revealed that formulations containing the EO of oregano at 1% (v/v) and lemongrass at 2% (v/v) could remove viable cells without altering any visual characteristics of fruit during the storage period. **Chapter 3** is a published article relating an in-depth study of the EO of *Origanum vulgare* and its main components, the isomeric monoterpenes thymol and carvacrol. Both compounds presented antibacterial activity with similar inhibitory concentrations (100 and 114 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively), and had the bacterial membrane as their main cellular target. Although, assays with citrus nursery trees revealed distinct action between compounds. Both thymol and the EO of *O. vulgare*, majorly composed of carvacrol, could significantly inhibit the development of CC lesions, while carvacrol alone did not show significant effect, which indicates a possible synergistic action between the EO compounds.

Finalmente, o **Capítulo 4** descreve as diferenças entre os OEs de quatro espécies do gênero *Cymbopogon* (*C. martini*, *C. schoenanthus*, *C. citratus*, *C. winterianus*) em relação a sua atividade antibacteriana contra *X. citri*, e sua composição. Os OEs avaliados apresentaram concentrações inibitórias que variaram entre 139 e 301 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e tiveram como principal alvo a membrana celular bacteriana. Os OEs de *C. martinii* e *C. schoenanthus* também foram capazes de reduzir o número de células viáveis de *X. citri* da superfície de limas ácidas do tipo “Tahiti” quando preparados em soluções aquosas, revelando seu potencial para aplicação no processamento de frutos cítricos.

Finally, **Chapter 4** describes the differences in EOs of four species of the *Cymbopogon* genus (*C. martini*, *C. schoenanthus*, *C. citratus*, *C. winterianus*), relating their *in vitro* antibacterial activity, and composition. The EOs present inhibitory concentrations between 139 and 301 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and had the cellular membrane as their main bacterial target. The EOs of *C. martini* and *C. schoenanthus* were capable of reducing the number of viable *X. citri* cells from acid limes were prepared in aqueous solution, revealing their potential in citrus fruit processing.

Keywords: Natural products; phytopathogens; biopesticides; *Xanthomonas*

Sumário

Introdução Geral.....	15
Revisão Bibliográfica	19
A Revolução Verde e o combate a fome	19
Pestes, pragas e patógenos	22
Agroquímicos, agrotóxicos e defensivos	24
Produtos Naturais, óleos essenciais e o desenvolvimento de “biopesticidas”	29
Referências.....	33
Capítulo 1.....	40
Introduction	43
Material and Methods	45
Search strategy	45
Selection step.....	46
Results	47
Selection and exclusion steps.....	47
Extraction Step and Selected articles	49
Discussion.....	70
Essential oils as antibacterial agents	70
Essential oils as antifungal agents	74
Conclusion	77
References	78
Capítulo 2.....	89
1. Introdução	92
2. Objetivos	97
2.1. Objetivo Geral	97
2.2. Objetivos específicos.....	97
3. Material e Métodos	98
3.1. Microrganismos.....	98
3.2. Óleos Essenciais	98
3.3. Avaliação de atividade antibacteriana contra <i>X. citri</i>	99

3.3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs enquanto princípios ativos da formulação.....	101
3.4. Ensaio de toxicidade em sementes	102
3.5. Inibição da formação de biofilme.....	104
3.6 Capacidade de permeabilização da membrana celular bacteriana	106
3.7. Potencial dos OEs em reduzir a formação de lesões do cancro cítrico	107
3.8. Avaliação da capacidade sanitizante das formulações em limas ácidas	108
3.7.1. Diferenciação dos morfotipos bacterianos	111
3.9. Avaliações físicas dos frutos após aplicação dos tratamentos.....	112
4.Resultados	114
4.1. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais contra <i>X. citri</i>	114
4.2. Composição dos óleos essenciais (OE) de orégano e de capim-limão	115
4.3. Interferência dos óleos essenciais de orégano e capim-limão na formação de biofilme de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	116
4.4. Efeitos dos óleos essenciais de orégano e capim-limão na permeabilização da membrana celular de <i>X. citri</i>	117
4.5. Avaliação da capacidade protetiva dos óleos essenciais de orégano e capim-limão em mudas de <i>Citrus sinensis</i> , contra a formação de lesões de cancro cítrico.	120
4.6. Óleos essenciais de orégano e capim-limão como princípios ativos da formulação.	121
4.7. Fitotoxicidade das formulações contendo Óleos essenciais de Orégano e Capim limão como princípios ativos em sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) e tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	124
4.8. Sanitização de limas ácidas “Tahiti” por formulações contendo óleos essenciais de orégano e de capim-limão como princípios ativos.....	125
4.8.1. Diferenciação dos morfotipos bacterianos obtidos.....	128
4.9. Avaliação das características físicas de limas ácidas “Tahiti” após aplicação das formulações contendo os OEs de orégano e capim-limão como princípios ativos.....	131
4.9.1. Simulação em ambiente de laboratório	131
4.9.2. Ensaio realizado em linha de beneficiamento	133
5. Discussão.....	138
6. Conclusão.....	142
7. Referências.....	143
Capítulo 3.....	151

Capítulo 4.....	154
Introduction.....	156
Material and Methods	158
Bacterial strain.....	158
Essential Oils.....	158
Bacterial growth inhibition assay	159
Live-dead microscopy	160
Acid limes sanitization assay	160
Results	162
EOs composition	162
EOs from species of the <i>Cymbopogon</i> genus inhibit <i>X. citri</i> growth.....	162
<i>Cymbopogon</i> EOs target the bacterial membrane.	164
Citrus sanitization.....	167
Discussion.....	171
Conclusion	175
References	184
Considerações finais.....	188

Introdução Geral

Pestes e patógenos são conhecidos como obstáculos importantes a uma produção regular e confiável de alimentos (Savary *et al.*, 2017, 2019). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), agência coordenada pela Organização das Nações Unidas (ONU), entre 20 e 40% da produção de alimento global é perdida devido a doenças e pragas (FAO, 2017; Savary *et al.*, 2019). Estas doenças são causadas por uma variedade de fatores, dentre os bióticos, por exemplo, temos bactérias, fungos, vírus, oomicetos, nematoides e outras espécies vegetais parasitas (Strange; Scott, 2005).

Uma das culturas nacionais de maior expressão e destaque, em caráter internacional, é a citricultura. As áreas produtoras estão distribuídas por todo território e diversificadas tanto em tamanho, desde pequenos produtores a até grandes latifúndios, quanto em sistemas de produção (De Oliveira *et al.*, 2018). Segundo levantamento feito pelo Fundo da Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) as estimativas para a safra da laranja de 2023/2024 se encontram na casa das 300 milhões de caixas, apenas no cinturão citrícola, região que compreende o estado de São Paulo e o Triângulo Sudoeste Mineiro, e que apresenta os maiores números de produção de citros do país (FUNDECITRUS, 2022). Estes valores demonstram a capacidade produtiva do país frente a diversos problemas fitossanitários que afetam a produção, causando perdas na quantidade e qualidade de frutos, bem como uma redução no número de árvores em pomares (De Oliveira *et al.*, 2018).

Dentre as várias doenças que afetam a cultura de citrus, destaca-se o cancro cítrico, considerado como praga quarentenária, responsável por grandes danos à produtividade e qualidade dos frutos obtidos. A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), também classificada como praga quarentenária no Brasil, é a causadora do cancro cítrico, conhecido por atacar uma ampla

variedade de citros de importância comercial (Sanches *et al.*, 2014). Em seus estágios iniciais, a doença provoca pequenas manchas no interior das folhas, que podem se desenvolver em lesões necróticas de coloração marrom, podendo também afetar os frutos, o que reduz seu valor de mercado. A progressão dos sintomas pode levar a desfolha da planta comprometendo seu desenvolvimento, a queda prematura dos frutos e devido ao caráter epidemiológico da doença, o tanto vendas no mercado interno quanto sua exportação se tornam limitadas (FUNDECITRUS, 2019).

Na tentativa de reduzir o impacto econômico causado pelo cancro cítrico, um método de manejo integrado foi implementado pelas agências regulatórias brasileiras. O manejo integrado se baseia em práticas como instalação de quebra-ventos entre pomares, uso de mudas, cultivares e porta-enxertos resistentes e saudáveis, aplicação de compostos bactericidas, usualmente a base de cobre, e a formação de barreiras sanitárias para impedir que a doença atinja novos pomares (FUNDECITRUS, 2019). Ainda que os métodos de controle sejam eficientes em muitos casos, quando há um inóculo elevado da bactéria, altas temperaturas e umidade, as condições para disseminação se tornam ideais, suprimindo os esforços de (De Oliveira *et al.*, 2011).

Ao considerar o modelo de agronegócio empregado atualmente, baseado em monoculturas intensivas, com cultivares de alta produtividade e geneticamente homogêneos, cria-se uma pressão seletiva que pode levar a emergência de novas pragas, o que, em conjunto com o comércio globalizado, permite o surgimento de novas interações entre plantas e patógenos e sua disseminação para várias regiões do globo (De Silva *et al.*, 2019; Strange; Scott, 2005; Stukenbrock; McDonald, 2008). Ambientes como este, associados ao uso indiscriminado de métodos de controle como a inserção de genes de resistência em espécies vegetais e a aplicação

de pesticidas químicos, também contribuem para a instabilidade das lavouras possibilitando o surgimento de epidemias (Savary *et al.*, 2019).

A última abordagem possibilita o surgimento de patógenos resistentes, fato já relatado pela literatura em diversos patógenos, inclusive em bactérias do gênero *Xanthomonas* (FERENCE *et al.*, 2018), o que leva produtores desinformados a aplicarem tratamentos em maior volume e frequência. Ademais, a aplicação de tais compostos, como os cúpricos, comuns a culturas de *Xanthomonas*, encontram cada vez mais limitações em grandes mercados consumidores, como a União Europeia e Estados Unidos, que tem feito esforços legais para a redução de pesticidas químicos, o que acaba por limitar as opções disponíveis aos produtores (Behlau *et al.*, 2011; Jacquet *et al.*, 2022). O cobre insolúvel, comumente utilizado, é capaz de causar efeitos tóxicos a própria planta, provocando danos ao sistema radicular das plantas, o que é dificilmente detectado, mas acarreta a uma queda na absorção de nutrientes, e em consequência um desbalanço nutricional (FUNDECITRUS, 2018). Ademais, o uso destes pesticidas causa preocupações devido aos riscos a trabalhadores rurais, acumulação na cadeia alimentar e contaminação de corpos de água, que podem causar danos à saúde da população em geral, além de possíveis agravamentos socioeconômicos (Andersson; Hughes, 2011; Bonner; Alavanja, 2017; Dayan *et al.*, 2009; Gavrilescu, 2005; Oerke, 2006; Stukenbrock; McDonald, 2008).

Ainda, de acordo com previsões de crescimento populacional global, é possível que até 2050 o mundo seja povoado por 9 bilhões de pessoas, criando uma demanda de 70% de aumento na produção de alimentos (Clay, 2011; Cohen, 2005; Crist *et al.*, 2017). Este aumento cria uma demanda por novas soluções que permitam o aumento na produção alimentar e respeitem as preocupações acerca do uso de substâncias químicas. Faz-se necessário que novas estratégias no combate de doenças na agricultura devam assegurar um desenvolvimento sustentável entre

produção e ambiente (De Silva *et al.*, 2019; Weller *et al.*, 2014). Neste contexto, o uso de óleos essenciais tem ganhado destaque em pesquisas recentes para aplicação em diversas áreas que envolvam o controle de microrganismos. Óleos essenciais (OEs) são descritos como líquidos oleosos, hidrofóbicos, aromáticos e voláteis, que podem ser obtidos de praticamente toda a planta (flores, raízes, folhas, frutos e demais partes) (Falleh *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2017).

Essas substâncias são consideradas, em geral, como GRAS (*Generally Recognized As Safe*, ou Geralmente Reconhecido como Seguro) pelo órgão de regulação americano (*Food and Drug Administration* – FDA), e como permitidas na agricultura orgânica pela União Européia (*European Commission* – Regulation 2018/848), por não apresentarem efeitos de tolerância quando usados como aditivos alimentares. Em geral, os componentes ativos de OEs mostram baixa toxicidade para mamíferos e uma persistência reduzida no ambiente devido à sua volatilidade (Isman *et al.*, 2011). Estas características, associadas ao amplo espectro de atividades, como anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica e antibacteriana, colocam os óleos essenciais como candidatos viáveis a serem explorados no desenvolvimento de soluções contra patógenos como a bactéria *X. citri*.

Revisão Bibliográfica

A Revolução Verde e o combate a fome

O modelo de produção agrícola passou por mudanças significativas durante o século XX. Anteriormente, a produção de alimentos consistia em sistemas tradicionais agrícolas, que dependiam da disponibilidade de recursos naturais e serviços ambientais. Entre o início dos anos 50 e o final dos anos 60, as práticas agrícolas foram modificadas pela adição de tecnologias como uso de fertilizantes para nutrição de plantas, controle artificial de pragas e pestes, mecanização do trabalho, técnicas de irrigação e uso de organismos geneticamente modificados (OGM) visando a alta produtividade. Este processo, que se iniciou na Europa e nos Estados Unidos, se espalhando para as Américas e Ásia, recebeu o nome de Revolução Verde (*Green Revolution*) (Evenson; Gollin, 2003; Soria-Lopez *et al.*, 2023).

Segundo Evenson & Gollin (2003), é importante entender a Revolução Verde não como um salto único de desenvolvimento, mas sim dois períodos distintos de expansão da produção agrícola. O primeiro, compreendido entre as décadas de 60 e 80, com países da Ásia e América Latina adotando as primeiras variedades de cultivares modernos e experienciando um aumento nos volumes produzidos, e um segundo período, entre os anos de 1981 e 2000, com a ampla utilização das variedades modernas seguido de um aumento na produtividade em todas as regiões do globo (com exceção da África Subsaariana) sem grandes expansões na área cultivável.

Levantamentos históricos sobre este período indicam dois movimentos que foram significativos na modernização das técnicas dos modelos agronômicos. O primeiro relata o desenvolvimento de variedades de alto rendimento de trigo sendo desenvolvidas como frutos de trabalhos científicos, com destaque para experimentos capitaneados por pesquisadores como o

americano Norman Borlaugh, e o italiano Nazareno Strampelli, ambos com o objetivo de aumentar o volume de alimento produzido no mundo (Tauger, 2023).

Alguns autores indicam que, embora tais esforços tenham sido na direção da busca por uma solução para a fome, industrialização e modernização, os objetivos eram maiores e visavam também o ganho de capital político. As fundações envolvidas e o próprio governo americano, responsáveis pelo financiamento de projetos ligados ao que hoje chamamos de Revolução Verde, tinham como objetivo o aumento de produção de trigo na Índia e em outros países asiáticos, fortalecendo os governos locais, evitando revoltas e impedindo o avanço da União Soviética, sendo inclusive apelidada de Revolução Verde, como forma de contrapor uma possível “Revolução Vermelha” (Tauger, 2023).

Mesmo que motivadas por agendas não claras, é inegável que as técnicas empregadas resultaram em uma queda no preço dos alimentos e consequentemente um aumento na disponibilidade de alimento no mundo (Soria-Lopez *et al.*, 2023). Por exemplo, entre 1960 e 2000, a produção nos países em desenvolvimento aumentou em 208% para o trigo, 109% para arroz, 157% para milho, 78% para batatas e 36% para mandioca (Pingali, 2012). Sendo este aumento em quantidade de alimentos seguido apenas de um modesto incremento na área de produção dessas culturas, denotando uma alta na produtividade por hectare (Evenson; Gollin, 2003; Pingali, 2012).

Ainda que os reflexos positivos deste período sejam humanitariamente notáveis, com significativa redução da fome e, como consequência, da pobreza em diversos países, a Revolução Verde também levou a consequências não desejáveis. No decorrer da promoção dos cultivares e técnicas mais modernas, algumas regiões não tão propícias ao processo de modernização como áreas de pouca chuva, por exemplo, como a África Subsaariana e o sul da Ásia, receberam pouca atenção, não apresentando os mesmos benefícios quanto regiões mais centralizadas. A distribuição

desigual de terras, de crédito e mercados consumidores levou pequenos produtores a falência devido a incapacidade de adquirir as tecnologias necessárias, além da queda no emprego rural devido a crescente mecanização (Burney *et al.*, 2010; Pingali, 2012). A intensa competição entre produtores também fez com que vários agricultores passassem a explorar culturas de grãos, como arroz, trigo e milho, de baixo valor nutricional, em detrimento de frutas, legumes e vegetais, de alto valor nutricional. A troca de culturas levou a diminuição de oferta de alimentos de maior valor nutricional, criando regiões de insegurança alimentar (Soria-Lopez *et al.*, 2023).

Ademais, mesmo que o salto de produtividade experienciado tenha evitado que grandes porções de terra com florestas nativas fossem desmatadas e transformadas em áreas de cultivo, a migração para um modelo intensivo de produção demandou a ampliação das capacidades dos recursos naturais. No longo prazo, o maior consumo de água na produção e o escoamento de produtos químicos como fertilizantes e pesticidas culminaram em danos a áreas superiores as preservadas pela Revolução Verde (Burney *et al.*, 2010; Soria-Lopez *et al.*, 2023).

Em suma, as diversas revisões literárias e históricas das últimas décadas relatam efeitos similares. A adoção das medidas desenvolvidas desde a década de 60, permitiu um avanço tecnológico considerável, tanto no campo da agricultura quando em áreas correlatas, porém, o custo no longo prazo, foi uma maior degradação ambiental, perda de biodiversidade, competições desiguais e crescente insegurança alimentar (Evenson; Gollin, 2003; Holt-Giménez; Altieri, 2013). Hoje, novas discussões sobre aumento populacional, abastecimento e mudanças climáticas aumentam a preocupação de líderes mundiais, enquanto alguns autores já apontam para uma nova revolução, pautada pela biotecnologia e sustentabilidade.

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), é esperado que a população mundial atinja aproximadamente 9.7 bilhões de pessoas em 2050 (ONU, 2022). Esse aumento

populacional, superior a 2 bilhões de pessoas quando comparado ao ano de 2023, indica a necessidade de um acréscimo no volume de alimentos produzidos mundialmente. Os estudos que abordam essas predições apontam que aumentos entre 60% e 110% seriam recomendados para suprir esse montante populacional, levando-se em conta o atual cenário de distribuição alimentar e métodos de produção agrícola utilizados (Tilman *et al.*, 2011; Van Dijk *et al.*, 2021).

Ao observarmos as metas expostas nos *Objetivos de Desenvolvimento Sustentável*, desenvolvidos pela ONU, o tópico de segurança alimentar é alocado no objetivo 2: Fome zero e agricultura sustentável. Sendo um dos pontos principais o compromisso de garantir acesso a alimentos seguros e nutritivos durante todo o ano, de modo a acabar com a fome. Porém, os mais recentes levantamentos indicam que a terra cultivável disponível no planeta seria insuficiente para atingir tais demandas, apontando para o emprego de técnicas agroecológicas, agricultura orgânica e biotecnologia, com capacidade de incrementar a produção agrícola sem o aumento no desgaste ambiental causado por práticas de agricultura intensivas (Haris *et al.*, 2023; Holt-Giménez; Altieri, 2013).

Pestes, pragas e patógenos

Somado ao desafio da incrementação da produção alimentar mundial sem os impactos ambientais já experimentados pelos modelos vigentes, se faz necessária também à elaboração de novas abordagens no combate a pragas e pestes que afetam a quantidade e qualidade dos produtos derivados do campo. De acordo com Savary *et al.* (2019), estimasse que as perdas advindas de pestes e doenças possam variar entre 10 e 28%, mediante estudo feito em culturas como trigo, milho, batata, arroz e soja.

O termo pestes e pragas usualmente é aplicado a uma grande diversidade de organismos como: bactérias, vírus, fungos, nematoides, artrópodes, moluscos, invertebrados e até plantas

parasitas (Bebber *et al.*, 2014). Pragas e patógenos não são, porém, agentes externos, mas sim parte dos processos ecológicos e da mudança nos modelos produtivos desde o século passado. Existente, na maioria dos casos, de maneira natural no ambiente, esses organismos são exemplos de coevolução contínua com as plantas que servem de alimento ou atuam como hospedeiro (Savary *et al.*, 2019).

Porém, a rápida transição de um ambiente de produção em pequena escala, rico em “agrobiodiversidade”, com ciclos únicos de cultivo, para um ambiente de cultivo intensivo, com homogeneidade genética e fisiológica das plantas e uso por vezes pouco controlado de fertilizantes e pesticidas, atrapalha os processos co-evolutivos naturais e facilita o surgimento de linhagens de patógenos mais resistentes, surtos e epidemias (Holt-Giménez; Altieri, 2013; Savary *et al.*, 2019; Zhan *et al.*, 2014).

Ao analisarmos um ambiente natural, mesmo patógenos como vírus e bactérias, por exemplo, apresentando taxas de mutação superiores aos organismos vegetais, a diversidade genética gerada pela reprodução sexuada em organismos vegetais, e as diferentes espécies presentes em uma mesma área, faz com que as taxas evolutivas entre parasita e hospedeiro sejam mais comparáveis. No entanto, quando o ambiente se torna geneticamente homogêneo e com organismos de uma mesma espécie em alta densidade, a evolução do patógeno é facilitada, de maneira que o surgimento de linhagens mais bem adaptadas, com alta infectividade e com capacidade de substituir as existentes é mais comum (Zhan *et al.*, 2014). Ainda que surtos possam ocorrer em ambientes naturais, as características do ambiente restringem os efeitos, que usualmente passam despercebidos (Burdon *et al.*, 2013).

Não apenas o modelo de cultivo em si, mas também o mundo globalizado, cada vez mais interconectado, possibilita a dispersão destes patógenos através de macrorregiões, o que

contribui para a maior possibilidade do surgimento de linhagens adaptadas e como consequência, surtos e pandemias (Kilpatrick, 2011; Zhan *et al.*, 2014). Os efeitos podem ser particularmente danosos ao ambiente quando o organismo exótico tem hospedeiros genéricos, como é o caso do fungo do gênero *Phytophthora* (Burdon *et al.*, 2013; Cobb *et al.*, 2012; Shearer *et al.*, 2012).

O desafio de controlar pestes e patógenos também se agrava com fenômenos mundiais como as mudanças climáticas, o que aumenta os riscos de novos surtos e surgimento de linhagens fitopatogênicas resistentes (Lykogianni *et al.*, 2021). Se faz necessário o uso de uma abordagem multivariada e dinâmica, conhecida como Controle de Pestes Integrado, que consiste em um conjunto de boas práticas para uso *in tandem*. Infelizmente, os custos, preocupações com produtividade e a falta de entendimento dos produtores acaba impedindo que todo conjunto de técnicas seja aplicado, reduzindo sua eficiência, apoiando significativa parte do esforço do combate as pragas e patógenos no uso de agroquímicos (Zhan *et al.*, 2014).

Agroquímicos, agrotóxicos e defensivos

O uso de agroquímicos, que se tornou intimamente associada as práticas de agricultura moderna, teve como seu primeiro representante o dicloro difenil tricloroetano (DDT), um inseticida organoclorado criado em 1939, e usado durante a Segunda Guerra Mundial para soldados se livrarem de pulgas e mosquitos, e que se tornou amplamente utilizado na agricultura e serviu de base para o desenvolvimento de diversos outros produtos. Foi só em 2001, mais de 60 anos depois de sua criação, que todos os países produtos signatários da Convenção de Estocolmo decidiram por banir o uso de DDT na prática agrícola, juntamente com outros produtos classificados a partir de então como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (Devi *et al.*, 2022).

Atualmente, esperasse que o mercado de agroquímicos, que envolve fertilizantes, promotores de crescimento e químicos de proteção, conhecidos também como pesticidas, ou seja,

aqueles cuja ação envolve o controle de ervas daninhas, insetos, roedores e outras doenças, atinja valores superiores a 300 bilhões de dólares até 2025 (Devi *et al.*, 2022; Udeigwe *et al.*, 2015). Esses valores evidenciam a dependência que a agricultura moderna tem de dessas substâncias, e expõem o desafio de diminuir a distância entre o aumento na produção de alimentos que acompanhe o crescimento da população mundial e o controle aos danos ao meio ambiente, esgotamento da água potável e degradação das terras cultiváveis (Dubey & Mailapalli 2016; Lykogianni *et al.* 2021).

Metais pesados como cobre (Cu), cádmio (Cd), níquel (Ni), zinco (Zn), cromo (Cr), cobalto (Co), manganês (Mn) e mercúrio (Hg), bem como outros, comumente utilizados em composições de pesticidas, já são encontrados em concentrações tóxicas em áreas de cultivo, alguns deles podendo inclusive ser absorvidos por plantas, culminando na sua inserção na cadeia alimentar (Arora *et al.*, 2008; Udeigwe *et al.*, 2015). A aplicação dessas substâncias de maneira intensiva, associada a sistemas de irrigação excessiva também facilitam o escoamento de contaminantes para corpos de água e sua percolação para reservas de água subterrâneas (Udeigwe *et al.*, 2015; Westermann *et al.*, 2001). E como muitas lavouras utilizam aquíferos e corpos de água próximos como sua fonte de irrigação, o efeito acumulativo dessas substâncias se intensifica (Arora *et al.*, 2008; Udeigwe *et al.*, 2015).

Agroquímicos como neonicotinóides, uma classe de pesticidas derivadas de nicotina, um dos mais recentes grupos de inseticidas desenvolvidos, é capaz de afetar negativamente o estabelecimento de novas colmeias de abelhas, potencialmente afetando a polinização inclusive de algumas culturas comerciais (Woodcock *et al.*, 2017). De maneira geral, a falta de estudos associada a capacidade destes químicos em afetar não só seu organismo ou organismos alvo, mas sim um amplo espectro, pode causar desequilíbrios populacionais, eliminar competidores e/ou

predadores naturais e até mesmo organismos benéficos (Schmidt-Jeffris, 2023). Seu uso contínuo também promove uma corrida evolutiva, dando origem a pragas cada vez mais resistentes, o que empurra os produtores para uso de pesticidas, ou mesmo “coquetéis” químicos, cada vez mais tóxicos e com aplicações mais frequentes (Ollinaho *et al.*, 2023).

Ademais, o uso destes pesticidas causa danos em comunidades microbiológicas, tanto do solo quanto de ambientes aquáticos, e consequentemente afetando a própria dinâmica de nutrientes destes ambientes e sua plasticidade (Lo, 2010). Muito desse potencial nocivo se deve a persistência de alguns desses compostos na natureza. Mesmo após sua proibição em 1983 na China, pesquisadores encontram resíduos de DDT e hexa clorobenzeno no ambiente, ambos classificados como POPs. (Huang *et al.*, 2023). E mesmo a degradação destes compostos, seja por decaimento ou por ação de microrganismos presentes no solo, por exemplo, não garante o cessar de possíveis efeitos tóxicos. Os subprodutos ou compostos intermediários formados durante esse processo pode ser até mais tóxicos do que os compostos originais (Huang *et al.*, 2023).

As vias de contaminação em seres humanos são divididas em quatro: dérmica, oral, pelos olhos e por vias respiratórias. Sua exposição pode ocorrer tanto de maneira ocupacional, como quando agricultores e trabalhadores rurais são afetados durante a aplicação, no uso doméstico, ou até mesmo quando aplicados em locais públicos como campos, estradas etc. (Kim *et al.*, 2017). As contaminações dérmicas são as mais comuns aos trabalhadores rurais e estão intimamente relacionadas ao uso de equipamentos de proteção individual (EPI) (Salvatore *et al.*, 2008). Além do uso excessivo, o mal uso dessas substâncias, como a aplicação sem fiscalização e de maneira desregulada, descarte incorreto, uso EPI inadequados, e até mesmo falsificação de produtos, são fatores que intensificam os as contaminações de água e solo, como também problemas de saúde

tanto em agricultores quanto ao consumidor final devido a exposição crônica a substâncias cumulativas (Zikankuba *et al.*, 2019).

Os riscos à saúde humana em relação a exposição a estes agroquímicos, variam de acordo com o princípio ativo em si e o nível de exposição (volume e tempo). Além disso, crianças, idosos e mulheres grávidas, por exemplo, podem ser mais sensíveis a alguns agroquímicos utilizados (Kim *et al.*, 2017). Exposição a pesticidas pode causar dores de cabeça, irritação nos olhos e na pele, náusea, diarreia, vômito e até mesmo condições duradouras já são ligadas a exposições a pesticidas como algumas variedades de câncer, leucemia, asma, doença de Parkinson, diabetes tipo 2, dentre outras (Bailey *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Koutras *et al.*, 2009; Moisan *et al.*, 2015; Raanan *et al.*, 2015; Sankoh *et al.*, 2016).

Em 1985, as preocupações com o uso e seguridade de tais substâncias levaram a FAO e a ONU, em conjunto com outras organizações internacionais, a propor regras internacionais para utilização de agroquímicos (Lykogianni *et al.*, 2021). Com o passar dos anos, esses regulamentos têm se intensificado em grande parte do mundo, porém, muitas substâncias consideradas perigosas ainda são utilizadas, legal ou ilegalmente, em países em desenvolvimento (Tariq *et al.*, 2007).

O Brasil, por sua vez, é considerado uma potência agrícola, se tornando o terceiro maior exportador de frutas e vegetais, posicionando o país como um destaque nos trópicos em relação a ciência, tecnologia e práticas (De Andrade *et al.*, 2023; Waisbich; Cabral, 2023). Ainda, há crescente preocupação em relação ao uso de pesticidas, visto que muitos produtores aplicam agroquímicos de maneira indiscriminada, com aplicações até mesmo diárias, estimulados pela falta de conhecimento e ausência de alternativas viáveis (De Andrade *et al.*, 2023). O alto consumo de pesticidas coloca o Brasil como maior importador e segundo maior consumidor de pesticidas, sendo superado apenas pela China (FAO, 2019; OLLINAHO *et al.*, 2023).

Mesmo com um consumo crescente desde 1980, é notável que a partir de 2016 o país apresenta uma mudança de postura no âmbito legislativo. O número de novos pesticidas disponíveis aumentou, com mais de 475 novos pesticidas sendo aprovados pela ANVISA desde 2019. Ao mesmo tempo, houve um notável dismantelamento de políticas de proteção ambiental, agricultura familiar e outras abordagens alternativas ao modo de produção “químico-intensivo”, classificadas como agroecológicas (Braga *et al.*, 2020; Ollinaho *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2023).

O próprio debate sobre como se referir a estes produtos causa controvérsia no país. Muitos, como pesquisadores, ambientalistas e ecologistas, contrários ao uso sem controle dessas substâncias, se referem a eles como “agrotóxicos”, termo que é carregado de valor negativo e que já aparece em leis brasileiras (Lei 7.802/89), enquanto fabricantes e produtores alegam que a terminologia correta é “defensivos agrícolas”, termo que também não é isento de valor, fazendo alusão a um bom produto que protege a lavoura contra pragas (PEREIRA, 2012).

Produtos proibidos, devido aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente, em diversos países, como os membros da União Europeia, como os fungicidas Mancozeb e Clorotalonil, os herbicidas Antrazina e Glifosato, e o inseticida Acefato são amplamente utilizados nas áreas agrícolas brasileiras (Souza *et al.*, 2023). Cerca de 41,5% dos produtos liberados no Brasil são proibidos na União Europeia e 25,6% nos Estados Unidos (Friedrich *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2023).

Dada a importância do Brasil como um dos maiores exportadores de alimento do mundo e, por consequência, de grande importância para a segurança alimentar em diversos outros países, as crescentes legislações em mercados importadores, como a União Europeia, que tem feito esforços para um controle mais eficiente de pesticidas, limitam as opções disponíveis para os produtores brasileiros (Braga *et al.*, 2020; Jacquet *et al.*, 2022). Fica clara a necessidade tanto de

uma abordagem sociopolítica capaz de modificar a maneira como o Brasil e o mundo praticam a agricultura moderna, como também o desenvolvimento de novas substâncias, com efetividade e menor potencial tóxico.

Produtos Naturais, óleos essenciais e o desenvolvimento de “biopesticidas”

Ainda que o modelo agrônômico possa, em curto prazo, produzir montantes impressionantes de alimento, há um consenso crescente de que a longo prazo, esse modelo pode inviabilizar práticas de agricultura familiar, reduzir a agrobiodiversidade e enfraquecer a resiliência do ecossistema agrário, nos deixando vulneráveis frente as mudanças climáticas (Holt-Giménez; Altieri, 2013). Práticas sustentáveis para o controle destas pestes não passam apenas pela redução do uso desses produtos, focando na produtividade, mas sim uma visão mais abrangente que englobe inovações práticas e economicamente viáveis, que permitam a manutenção da produtividade, ao mesmo tempo que não se desprendam dos fatores ecológicos e ambientais (Zhan *et al.*, 2014).

A necessidade por novos agroquímicos, com alta efetividade, baixa toxicidade para seres humanos, animais e ambiente existe há décadas, muito devido ao surgimento de organismos resistentes (Strobel *et al.*, 2004). Necessidade esta que despertou o interesse, tanto acadêmico quanto empresarial. Pesquisa e desenvolvimento sobre o uso de produtos naturais na proteção das lavouras têm se intensificado nos últimos 20 anos, fato observado devido ao aumento do número de patentes e publicações neste período (Sparks *et al.*, 2023).

O uso de pesticidas e agroquímicos tradicionais traz sérias desvantagens, já elencadas em seções anteriores, como, por exemplo, os riscos ao meio ambiente, a saúde humana e o aumento da pressão seletiva no campo, permitindo o surgimento de novas pragas resistentes. Tais desvantagens trazem novos desafios no desenvolvimento de químicos mais seguros para proteção

das lavouras, que além de ativos contra seus organismos alvo, devem ser mais seguros a saúde humana, a organismos não-alvo e ao ambiente. Não obstante, esses produtos devem ser capazes de driblar a resistência das pragas aos pesticidas tradicionais, evitando assim novos surtos (Walia *et al.*, 2017).

Neste contexto, o uso de produtos naturais como fontes abundantes de ingredientes ativos para novos agroquímicos, seja para seu uso como princípio ativo ou como fonte primária para o desenvolvimento de produtos semi-sintéticos, é apontado como uma alternativa viável aos pesticidas químicos tradicionais (Lorsbach *et al.*, 2019; Walia *et al.*, 2017). Muito dessa relevância se deve ao fato de que substâncias fitoquímicas, usualmente, são moderadamente tóxicas, menos persistentes no ambiente e com maior biodegradabilidade (Walia *et al.*, 2017).

Por certo, grande parte da importância destes produtos reside em sua estrutura química. Usualmente, químicos naturais possuem uma grande variabilidade estrutural, com estruturas complexas, ricas em centros quirais, carbonos hibridizados (sp^3), anéis, oxigênio, nitrogênio e grupos fosfato e sulfato (Dayan *et al.*, 2009). Essa variabilidade estrutural permite uma vasta gama de atividades biológicas, com diversos modos de ação, ao mesmo tempo que dificulta a síntese química para reprodução dessas moléculas (Hüter, 2011). Ainda, a ausência de estruturas “artificiais” (ou não naturais) nestas moléculas confere uma maior biodegradabilidade a elas, seja por uma meia-vida reduzida ou pela ação da microbiota do solo (Dayan *et al.*, 2009).

A alta variabilidade dessas substâncias os tornou ativos importantes no manejo integrado de pestes. O seu uso permite que produtores reduzam as aplicações dos agroquímicos tradicionais, diminuindo os danos ao ambiente, a saúde humana e reduzindo o impacto em organismos não-alvo. Além disso, a combinação entre químicos de diferentes origens permite minimizar as chances de surgimento de linhagens resistentes (Essiedu *et al.*, 2020; Hintz *et al.*, 2015).

Dentro do grupo de produtos naturais, voltados para uso agrícola no controle de pragas, aqui destaca-se o uso de óleos essenciais (OEs), substâncias naturais existentes em organismos vegetais onde atuam como agentes de defesa e antiestresse, aumentando a resiliência da planta a fatores bióticos e abióticos (Walia *et al.*, 2017). A alta variabilidade e complexidade das substâncias presentes nos OEs, fruto do metabolismo secundário vegetal, são uma parte considerável do mercado de biopesticidas.

Segundo Sonwa (2000), OEs são definidos como uma mistura de produtos formados no citoplasma de células vegetais, e usualmente estão presentes na forma de pequenas gotículas entre as células, sendo caracterizados como voláteis e não voláteis (Ríos, 2015). Já a Organização Internacional para Normatização (*International Organization for Standardization* (ISO)) define OEs como o produto obtido de material vegetal natural, por destilação a vapor, por processos mecânicos do epicarpo de frutas cítricas, ou por destilação ao seco, depois da separação da fase aquosa. (Ríos, 2015).

Devido à alta variabilidade de suas composições, como, por exemplo, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, fenóis, cumarinas, antraquinonas, alcalóides e outras substâncias, OEs tem sido explorados em diversas áreas industriais (Ríos, 2015). Além de aplicações bem difundidas em perfumaria como aromatizantes, OEs são amplamente utilizados na odontologia, indústrias de matérias de limpeza e produtos sanitários, na indústrias de alimentos como flavorizante, e também na agricultura (Jugreet *et al.*, 2020). Ademais, seu uso em áreas de saúde humana, vai além de práticas alternativas de saúde e bem estar, como aromaterapia e massoterapia, seus componentes já se mostram ativos contra uma grande variedade de patógenos, e suas propriedades sinérgicas com antibióticos conhecidos são alvos de estudos recentes (Aljaafari *et al.*, 2021; Jugreet *et al.*, 2020).

Além de patógenos de interesse médico, diversos estudos mostram a versatilidade desses produtos como antimicrobianos contra fitopatógenos de interesse econômico, incluindo *X. citri* e outras espécies do gênero (Antonioli *et al.*, 2020; De Clerck *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021). Atualmente, é possível encontrar diversos OEs bem como seus princípios ativos isolados já registrados em órgãos de controle com o EPA (*Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos), como por exemplo, OEs de citronela (bem como seus princípios ativos, como citral, geraniol e o citronelol), eucalipto, orégano, tomilho dentre outros. Exemplos de produtos comerciais não são incomuns, como o óleo de neem, um OE obtido das amêndoas da planta indiana *Azadirachta indica*, com propriedades inseticidas, já mostrou efeito contra outros fitopatógenos (Ali *et al.*, 2017). Ainda, o cinamaldeído ((2E)-3-Phenylprop-2-enal), o principal componente do OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) que confere seu odor e sabor característicos, tem ação uma diversa ação antimicrobiana e já é amplamente utilizado no pós-colheita como um preservativo (Qu *et al.*, 2019).

Este diverso leque de propriedades somadas as necessidades de produção alimentar consciente e ecológica, enunciadas nesta revisão bibliográfica, colocam os OEs como viáveis candidatos para a elaboração de produtos que atendem tanto as exigências quanto sua eficiência quanto sua seguridade ambiental e para saúde humana. Os próximos capítulos deste documento aprofundam as descobertas sobre OEs e seu efeito antibacteriano contra o fitopatógeno *X. citri*, causador do cancro cítrico.

Referências

- Ali, E.O.M.; Shakil, N. A.; Rana, V. S.; Sarkar, D. J.; Majumder, S.; Kaushik, P.; Singh, B. B.; Kumar, J. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 108, p. 379–387, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901730448X>.
- Aljaafari, M. N.; Alali, A. O.; Baqais, L.; Alqubaisy, M.; Alali, M.; Molouki, A.; Ong-Abdullah, J.; Abushelaibi, A.; Lai, K. S.; Lim, S. H. E. An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 3, 2021.
- Andersson, D. I.; Hughes, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 901–911, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x>.
- Antonioli, G.; Fontanella, G.; Echeverrigaray, S.; Paula, A.; Delamare, L.; Pauletti, G. F.; Barcellos, T. Poly (lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control : In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 326, n. May, p. 126997, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>.
- Arora, M.; Kiran, B.; Rani, S.; Rani, A.; Kaur, B.; Mittal, N. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 811–815, 2008.
- Bailey, H. D.; Infante-Rivard, C.; Metayer, C.; Clavel, J.; Lightfoot, T.; Kaatsch, P.; Roman, E.; Magnani, C.; Spector, L. G.; Th. Petridou, E.; Milne, E.; Dockerty, J. D.; Miligi, L.; Armstrong, B. K.; Rudant, J.; Fritschi, L.; Simpson, J.; Zhang, L.; Rondelli, R.; Baka, M.; Orsi, L.; Moschovi, M.; Kang, A. Y.; Schüz, J. Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 137, n. 11, p. 2644–2663, 2015.
- Bebber, D. P.; Holmes, T.; Gurr, S. J. The global spread of crop pests and pathogens. **Global Ecology and Biogeography**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 1398–1407, 2014.
- Behlau, F.; Canteros, B. I.; Minsavage, G. V.; Jones, J. B.; Graham, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 12, p. 4089–4096, 2011.
- Bonner, M. R.; Alavanja, M. C. R. Pesticides, human health, and food security. **Food and Energy Security**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 89–93, 2017.
- Braga, A. R. C.; De Rosso, V. V.; Harayashiki, C. A. Y.; Jimenez, P. C.; Castro, Í. B. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s43016-020-0100-3>.
- Burdon, J. J.; Thrall, P. H.; Ericson, L. Genes, communities & invasive species: Understanding

the ecological and evolutionary dynamics of host-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 400–405, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2013.05.003>.

Burney, J. A.; Davis, S. J.; Lobell, D. B. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 26, p. 12052–12057, 2010.

Clay, J. Freeze the footprint of food. **Nature**, [s. l.], v. 475, n. 7356, p. 287–289, 2011.

Cobb, R. C.; Filipe, J. A. N.; Meentemeyer, R. K.; Gilligan, C. A.; Rizzo, D. M. Ecosystem transformation by emerging infectious disease: Loss of large tanoak from California forests. **Journal of Ecology**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 712–722, 2012.

Cohen, J. E. No Title. **Scientific American**, [s. l.], v. 293, n. 3, p. 48–55, 2005.

Crist, E.; Mora, C.; Engelman, R. The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. **Science**, [s. l.], v. 356, n. 6335, p. 260–264, 2017. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aal2011>.

Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 4022–4034, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>.

De Andrade, J. C.; Galvan, D.; Kato, L. S.; Conte-Junior, C. A. Consumption of fruits and vegetables contaminated with pesticide residues in Brazil: A systematic review with health risk assessment. **Chemosphere**, [s. l.], v. 322, n. February, p. 138244, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138244>.

De Clerck, C.; Maso, S. D.; Parisi, O.; Dresen, F.; Zhiri, A.; Haissam Jijakli, M. Screening of antifungal and antibacterial activity of 90 commercial essential oils against 10 pathogens of agronomical importance. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2020.

De Oliveira, R. P.; Girardi, E. A.; Sulzsbach, M.; Schwarz, S. F.; Carvalho, F. L. C.; Bernardi, L. de M. **Tecnologias para Prevenção e Manejo do Huanglongbing (HLB) em Polos de Citricultura de Base Familiar**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1101890/1/DOCUMENTO471.pdf>.

De Oliveira, A. G.; Murate, L. S.; Spago, F. R.; Lopes, L. de P.; Beranger, J. P. de O.; Martin, J. A. B. S.; Nogueira, M. A.; Mello, J. C. P. de; Andrade, C. G. T. de J.; Andrade, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.

De Silva, N. I.; Brooks, S.; Lumyong, S.; Hyde, K. D. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 133–148, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>.

Devi, P. I.; Manjula, M.; Bhavani, R. V. Agrochemicals, Environment, and Human Health.

Annual Review of Environment and Resources, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 399–421, 2022.

Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-environ-120920-111015>.

Dubey, A.; Mailapalli, D. R. Nanofertilisers, Nanopesticides, Nanosensors of Pest and Nanotoxicity in Agriculture. [s. l.], n. February 2017, p. 307–330, 2016.

Essiedu, J. A.; Adepoju, F. O.; Ivantsova, M. N. Benefits and limitations in using biopesticides: A review. **AIP Conference Proceedings**, [s. l.], v. 2313, n. December, 2020.

Evenson, R. E.; Gollin, D. Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. **Science**, [s. l.], v. 300, n. 5620, p. 758–762, 2003.

Falleh, H.; Ben Jemaa, M.; Saada, M.; Ksouri, R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 330, n. January, p. 127268, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>.

Ference, C. M.; Gochez, A. M.; Behlau, F.; Wang, N.; Graham, J. H.; Jones, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1302–1318, 2018.

Friedrich, K.; Da Silveira, G. R.; Amazonas, J. C.; Do Monte Gurgel, A.; De Almeida, V. E. S.; Sarpa, M. International regulatory situation of pesticides authorized for use in Brazil: Potential for damage to health and environmental impacts. **Cadernos de Saude Publica**, [s. l.], v. 37, n. 4, 2021.

FUNDECITRUS. Pesquisadores do FUNDECITRUS e IAC recomendam uso racional do cobre para controle do cancro cítrico. Comunicação Fundecitrus, 2018. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/pesquisadores-do-fundecitrus-e-iac-recomendam-uso-racional-do-cobre-para-controle-do-cancro-citrico/764>. Acessado em 13 de dezembro de 2023.

Gavrilescu, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 497–526, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elsc.200520098>.

Haris, M.; Hussain, T.; Mohamed, H. I.; Khan, A.; Ansari, M. S.; Tauseef, A.; Khan, A. A.; Akhtar, N. Nanotechnology – A new frontier of nano-farming in agricultural and food production and its development. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 857, n. October 2022, p. 159639, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159639>.

Hintz, T.; Matthews, K. K.; Di, R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015.

Holt-Giménez, E.; Altieri, M. A. Agroecology, food sovereignty, and the new green revolution. **Agroecology and Sustainable Food Systems**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 90–102, 2013.

Huang, D.; Gao, L.; Zhu, S.; Qiao, L.; Liu, Y.; Ai, Q.; Xu, C.; Wang, W.; Lu, M.; Zheng, M. Target and non-target analysis of organochlorine pesticides and their transformation products in an agrochemical-contaminated area. **Chemosphere**, [s. l.], v. 324, n. March, p. 138314, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138314>.

Hüter, O. F. Use of natural products in the crop protection industry. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 185–194, 2011.

Isman, M. B.; Miresmailli, S.; Machial, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 197–204, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-010-9170-4>.

Jacquet, F.; Jeuffroy, M. H.; Jouan, J.; Le Cadre, E.; Litrico, I.; Malausa, T.; Reboud, X.; Huyghe, C. Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. **Agronomy for Sustainable Development**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–24, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00742-8>.

Jugreet, B. S.; Suroowan, S.; Rengasamy, R. R. K.; Mahomoodally, M. F. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 101, n. September 2019, p. 89–105, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.025>.

Kilpatrick, A. M. Globalization, Land Use, and the Invasion of West Nile Virus. **Science**, [s. l.], v. 334, n. 6054, p. 323–327, 2011. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1201010>.

Kim, K. H.; Kabir, E.; Jahan, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 575, p. 525–535, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.

Koutras, S.; Lynch, C. F.; Xiaomei, M.; Won, J. L.; Hoppin, J. A.; Christensen, C. H.; Andreotti, G.; Freeman, L. B.; Rusiecki, J. A.; Lifang, H.; Sandler, D. P.; Alavanja, M. C. R. Heterocyclic aromatic amine pesticide use and human cancer risk: Eesults from the U.S. Agricultural Health Study. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 124, n. 5, p. 1206–1212, 2009.

Lo, C. C. Effect of pesticides on soil microbial community. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 348–359, 2010.

Lorsbach, B. A.; Sparks, T. C.; Cicchillo, R. M.; Garizi, N. V.; Hahn, D. R.; Meyer, K. G. Natural products: a strategic lead generation approach in crop protection discovery. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 75, n. 9, p. 2301–2309, 2019.

Lu, W.; Cui, R.; Zhu, B.; Qin, Y.; Cheng, G.; Li, L.; Yuan, M. Influence of clove essential oil immobilized in mesoporous silica nanoparticles on the functional properties of poly(lactic acid) biocomposite food packaging film. **Journal of Materials Research and Technology**, [s. l.], v. 11, p. 1152–1161, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785421000983>.

Lykogianni, M.; Bempelou, E.; Karamaouna, F.; Aliferis, K. A. Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 795, p. 148625, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148625>.

Moisan, F.; Spinosi, J.; Delabre, L.; Gourlet, V.; Mazurie, J. L.; Bénatru, I.; Goldberg, M.; Weisskopf, M. G.; Imbernon, E.; Tzourio, C.; Elbaz, A. Association of parkinson's disease and its subtypes with agricultural pesticide exposures in men: A case-control study in France. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 123, n. 11, p. 1123–1129, 2015.

Oerke, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, [s. l.], v. 144, n. 1, p. 31–43, 2006.

Ollinaho, O. I.; Pedlowski, M. A.; Kröger, M. Toxic turn in Brazilian agriculture? The political economy of pesticide legalisation in post-2016 Brazil. **Third World Quarterly**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 612–630, 2023. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01436597.2022.2153031>.

Pandey, A. K.; Kumar, P.; Singh, P.; Tripathi, N. N.; Bajpai, V. K. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. JAN, p. 1–14, 2017.

Pingali, P. L. Green revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 31, p. 12302–12308, 2012.

Qu, S.; Yang, K.; Chen, L.; Liu, M.; Geng, Q.; He, X.; Li, Y.; Liu, Y.; Tian, J. Cinnamaldehyde, a Promising Natural Preservative Against *Aspergillus flavus*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02895/full>.

Raanan, R.; Harley, K. G.; Balmes, J. R.; Bradman, A.; Lipsett, M.; Eskenazi, B. Early-life exposure to organophosphate pesticides and pediatric respiratory symptoms in the CHAMACOS cohort. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 179–185, 2015.

Ríos, J. L. Essential Oils. In: ESSENTIAL OILS IN FOOD PRESERVATION, FLAVOR AND SAFETY. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 3–10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>.

Salvatore, A. L.; Bradman, A.; Castorina, R.; Camacho, J.; López, J.; Barr, D. B.; Snyder, J.; Jewell, N. P.; Eskenazi, B. Occupational behaviors and farmworkers' pesticide exposure: Findings from a study in Monterey County, California. **American Journal of Industrial Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 782–794, 2008.

Sanches, A. L. R.; Miranda, S. H. G. de; Belasque Junior, J.; Bassanezi, R. B. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 549–566, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032014000300008&lng=pt&tlng=pt.

Sankoh, A. I.; Whittle, R.; Semple, K. T.; Jones, K. C.; Sweetman, A. J. An assessment of the impacts of pesticide use on the environment and health of rice farmers in Sierra Leone. **Environment International**, [s. l.], v. 94, p. 458–466, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.034>.

Savary, S.; McRoberts, N.; Esker, P. D.; Willocquet, L.; Teng, P. S. Production situations as drivers of crop health: evidence and implications. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 867–876, 2017.

Savary, S.; Willocquet, L.; Pethybridge, S. J.; Esker, P.; McRoberts, N.; Nelson, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

Schmidt-Jeffris, R. A. Nontarget pesticide impacts on pest natural enemies: progress and gaps in current knowledge. **Current Opinion in Insect Science**, [s. l.], v. 58, p. 101056, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101056>.

Shearer, B. L.; Crane, C. E.; Dunne, C. P. Variation in vegetation cover between shrubland, woodland and forest biomes invaded by *Phytophthora cinnamomi*. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 413–424, 2012.

Sonwa, M. M. **ISOLATION AND STRUCTURE ELUCIDATION OF ESSENTIAL OIL CONSTITUENTS Comparative Study of the Oils of**. [S. l.: s. n.], 2000.

Soria-Lopez, A.; Garcia-Perez, P.; Carpena, M.; Garcia-Oliveira, P.; Otero, P.; Fraga-Corral, M.; Cao, H.; Prieto, M. A.; Simal-Gandara, J. Challenges for future food systems: From the Green Revolution to food supply chains with a special focus on sustainability. **Food Frontiers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 9–20, 2023.

Souza, M. C. O.; Cruz, J. C.; Cesila, C. A.; Gonzalez, N.; Rocha, B. A.; Adeyemi, J. A.; Nadal, M.; Domingo, J. L.; Barbosa, F. Recent trends in pesticides in crops: A critical review of the duality of risks-benefits and the Brazilian legislation issue. **Environmental Research**, [s. l.], v. 228, n. March, 2023.

Sparks, T. C.; Sparks, J. M.; Duke, S. O. Natural Product-Based Crop Protection Compounds—Origins and Future Prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 2259–2269, 2023.

Strange, R. N.; Scott, P. R. Plant disease: A threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 43, n. Figure 1, p. 83–116, 2005.

Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.

Stukenbrock, E. H.; McDonald, B. A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 75–100, 2008. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.010708.154114>.

Tariq, M. I.; Afzal, S.; Hussain, I.; Sultana, N. Pesticides exposure in Pakistan: A review. **Environment International**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1107–1122, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412007001389>.

Tauger, M. B. Nazareno Strampelli and the first Green Revolution. **Journal of International Development**, [s. l.], n. March, p. 1–28, 2023.

Tilman, D.; Balzer, C.; Hill, J.; Befort, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 50, p. 20260–20264, 2011.

Udeigwe, T. K.; Teboh, J. M.; Eze, P. N.; Hashem Stietiya, M.; Kumar, V.; Hendrix, J.; Mascagni, H. J.; Ying, T.; Kandakji, T. Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 151, p. 267–279, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.024>.

Van Dijk, M.; Morley, T.; Rau, M. L.; Saghai, Y. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. **Nature Food**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 494–501, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>.

Waisbich, L. T.; Cabral, L. Brazilian Civil Society and South–South Cooperation: Countering the Green Revolution from Abroad. In: LÍDIA CABRAL, Sérgio Sauer and Alex Shankland (org.). **Transforming Development Knowledge**. [S. l.: s. n.], 2023. v. 54, p. 127.

Walia, S.; Saha, S.; Tripathi, V.; Sharma, K. K. Phytochemical biopesticides: some recent developments. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 989–1007, 2017.

Weller, C. S.; Culbreath, A. K.; Gianessi, L.; Godfrey, L. D. No The Contributions of Pesticides to Pest Management in Meeting the Global Need for Food Production by 2050. **Council for Agricultural Science and Technology -USA**, [s. l.], p. 1–28, 2014. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173010754>.

Westermann, D. T.; Bjorneberg, D. L.; Aase, J. K.; Robbins, C. W. Phosphorus Losses in Furrow Irrigation Runoff. **Journal of Environmental Quality**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 1009–1015, 2001.

Woodcock, B. A.; Bullock, J. M.; Shore, R. F.; Heard, M. S.; Pereira, M. G.; Redhead, J.; Ridding, L.; Dean, H.; Sleep, D.; Henrys, P.; Peyton, J.; Hulmes, S.; Hulmes, L.; Sárospataki, M.; Saure, C.; Edwards, M.; Genersch, E.; Knäbe, S.; Pywell, R. F. Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. **Science**, [s. l.], v. 356, n. 6345, p. 1393–1395, 2017.

Zhan, J.; Thrall, P. H.; Burdon, J. J. Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 570–575, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.010>.

Zikankuba, V. L.; Mwanyika, G.; Ntwenya, J. E.; James, A. Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. **Cogent Food and Agriculture**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1601544>.

Capítulo 1

Essential Oils as alternatives in the control of phytopathogens: A systematic review of the last five years

Authors: Vítor Rodrigues Marin; Caio Felipe Cavicchia Zamunér; Eduarda Araújo dos Santos; Henrique Ferreira; Daiane Cristina Sass

Biochemistry Building, Dept. of General and Applied Biology, Institute of Biosciences, State University of São Paulo, Rio Claro, SP, Brazil

Abstract

To increase agricultural production and feed the growing human population, the control of phytopathogens, known to affect the quality and yield of fruit and vegetable production, is of utmost importance. Chemical pesticides are by far the most used defensives to control plant diseases, which, despite their effectiveness, are already associated with several health issues in humans, besides their toxic and cumulative effects on the environment and food chain. In this context, natural products appear as viable alternatives to reduce the volume of pesticides used in the field and yet, have a recognized potential to be used in disease management programs. This systematic review highlights the use of essential oils (EOs) as control agents against microbial phytopathogens. Defined as oily, aromatic, and hydrophobic liquids obtained from any part of the plants, EOs are known for their diverse activities, such as antioxidants, anti-inflammatory, antimicrobial, and others. Furthermore, EOs are classified as GRAS (Generally Recognized as Safe) when used as food additives due to their moderate effects on mammals and low persistence in the environment. These characteristics point to EOs as viable alternatives in the research and development of new products and approaches for the control of diseases caused by phytopathogens. The present systematic review reports on scientific novel papers published between January 2019 - June 2023 (approximately five years) that relate the use of EOs against phytopathogens.

Keywords: Essential oils; phytopathogens; systematic review; biocontrol; pesticides

Introduction

The main goal in food production in this century is the conciliation the use of chemical pesticides, that control food losses by pests and pathogens, and their adverse effects on human health and environmental sustainability. Estimates on economically significant crops produced worldwide pointed that 8 to 40% of the productivity is lost to pests and pathogens each year (Savary *et al.* 2019). Phytopathogenic microorganisms are one of the major contributors to these figures, especially in the tropical region (Wilson 2016; Abdullahi *et al.* 2020).

In general, the control method for viruses, bacteria, and fungi in agriculture is based on the use of antimicrobials, like copper-based substances and antibiotics (Sundin *et al.* 2016). While effective, more so when part of an integrated management practice, the adverse effects on human health and cumulative characteristics of these substances in the environment and food chain raise concerns about their sustainable and indiscriminate use (Abdullahi *et al.* 2020; De Clerck *et al.* 2020). Furthermore, the recurrent application of these substances increases the selective pressure and can promote the emergence of resistant microorganisms, which often results in the increase of frequency and dosages of applications (Ollinaho *et al.* 2023).

Therefore, there is a growing necessity to seek for more sustainable alternatives that can reduce the risks to human health and the environment. Products of natural origin derived from plants, microorganism and/or animals, are generally less persistent in the environment, moderately toxic and highly biodegradable. These natural molecules can contribute in the development of biopesticides that while less toxic are still able to reduce the negative effects of phytopathogens in the food chain (Walia *et al.* 2017).

This review highlights the use of essential oils (EOs) as viable sources for the development of new biopesticides. EOs are defined as hydrophobic liquids composed of volatile, aromatic, and

naturally oily substances, that can be obtained from all plant parts like branches, leaves, roots, flowers, bark, and seeds (Pandey et al. 2017). These substances are widely used as fragrances and flavoring agents in food and cosmetic industries, and have a diverse array of activities, such as antibacterial and antimycotic, making them potential candidates for the development of new products for phytopathogen control (Bajpai et al. 2011; De Clerck et al. 2020).

Therefore, this work aimed to investigate the database of Scopus to find novel scientific papers published in the last decade that report the use of EOs as active antimicrobials against phytopathogens. While forming a robust database for future research, this work aimed to point remarks in EOs research and any possible gaps to be cleared by researchers of the area.

Material and Methods

Search strategy

The database used for the article search was the Scopus® database, that is curated and maintained by the publisher Elsevier®. Scopus is a diverse database, multidisciplinary, that counts in 2023, with more than 87 million documents indexed in more than seven thousand journals, according to the publisher.

Search strings, which consisted of keywords connected by Boolean operators (AND, OR, NO), to include or exclude specific words, were elaborated as follows:

String A: “essential oil” AND phytopathogen AND antimicrobial OR antibacterial OR antifungal.

And,

String B: “essential oil” AND phytopathogen OR “plant pathogen” AND antimicrobial OR antibacterial OR antifungal AND NOT medical OR clinical.

The search platform already includes similar and plural words, the word “oil” for instance, generates results for “oils” also. The search fields were the Keywords, Abstract, and Title of the work, and the period taken into consideration was between January 2013 and June 2023, roughly ten years.

Selection step

The articles found were exported and submitted to the Rayyan platform (<https://rayyan.ai> (free license)) (Ouzzani et al. 2016), used in the management of systematic reviews to allow the screening of works.

Screening criteria excluded other revisions, both narrative and systematic, book chapters and unavailable articles (only available or partially available through payment). Still, papers that reported the use of EOs against clinical pathogens or for other purposes, such as insecticides, were also excluded. In addition, works that reported the used of plant extracts, such as ethanolic or solvent-based and that did not consider their study object as an EOs, were also excluded. Papers that did not specify which plant species was the source of the EO were also excluded. Finally, papers that did not clearly stated the active concentrations, or papers that the EOs did not have activity in any concentrations evaluated, were also excluded.

The works screened were reviewed and the information about authors, year of publication, plant species from where the EO was obtained, species of phytopathogens tested and the inhibitory concentrations, were extracted. The inhibitory concentrations were displayed as reported by authors, which many relied on well-known indexes, such as MIC (Minimum Inhibitory Concentration), $IC_{50/90}$ (Inhibitory Concentration for 50/90% of growth), $EC_{50/90}$ (Compound concentration that produce 50/90% of the maximum response), MBC or MFC (Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration) or other similar terms as defined by each respective author. In the absence of these, the results were represented to the best of our knowledge, with priority to the highest inhibition values for treatments. Reports that used the relative growth (in percentage) as an inhibition measurement had the most effective inhibitory concentration considered. The

letters TGI (Total Growth Inhibition) were used to specify that the reported concentration completely inhibited the microorganisms growth in proposed assay.

Results

Selection and exclusion steps

analyzed according to the exclusion criterion. Table 1 shows the number of works removed from the review according to their classification.

Table 1. Total articles found on Scopus between January 2019 and June 2023, and the reasons for exclusions.

Reason for Exclusion	132 (100%)
Non-use of Essential Oils	17
Not used Against phytopathogens	5
Revisions and Book Chapters	5
Unavailable works	9
Did not specify the plant species	2
Did not clearly specified inhibitory concentrations	1
	93 (70.45%)

After the selection step, 93 (70.45%) articles were taken to the extraction phase, with 39 (29.54%) being excluded. Among those excluded, 12.87% (17) did not use EOs as their study subjects, only mentioning EOs in their bibliography or using plant extracts not defined by the author as EOs. Similarly, 3.78% (5) of articles were excluded for not investigating EO action against phytopathogen, and finally, 1 work (0.75%) did not clearly specify the inhibitory concentration.

It is important to notice that 9 (6.81%) were excluded for not being available, for technical reasons, such as offline servers or broken links at time of research, or for only being fully accessible through payment (*paywall*), even when consulted through institutional access (São Paulo State University – UNESP). Furthermore, all papers accepted were published in English, Portuguese or Spanish, with none being reject for the main language of the publication.

Figure 1, below, reveals the number of accepted articles for each year that followed to the extraction step.

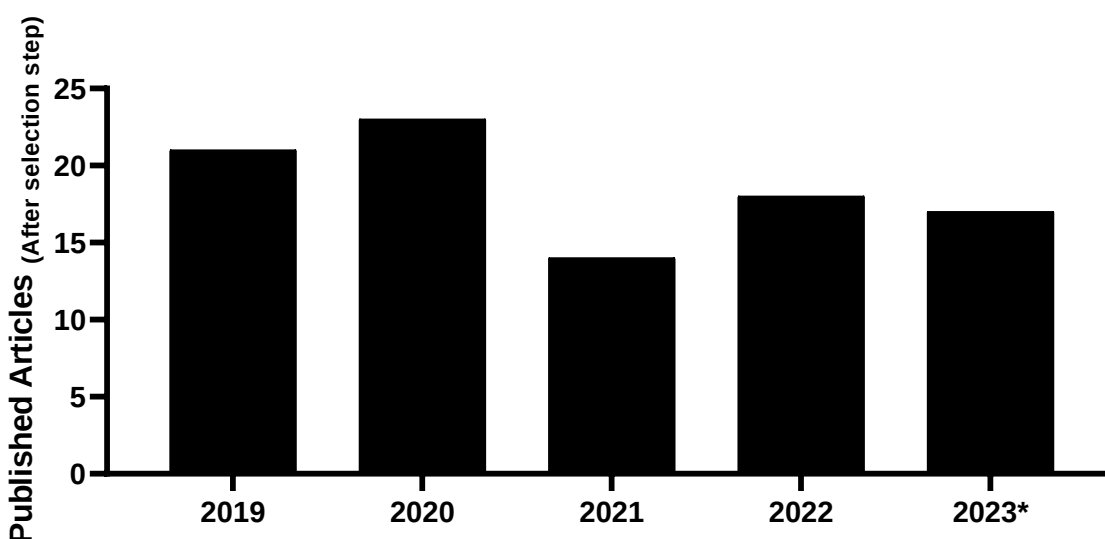


Figure 1. Number of published papers about essential oils against phytopathogens according to year of publication (January 2019 to June 2023). *: only papers published until June accounted for.

A slight decrease in the number of published articles is noticeable in the year 2021 (14), followed by a recovery in the number of publications in 2022 (18). This drop was reported by other authors for diverse areas of research and could be related to the COVID-19 pandemic, mainly in the year 2021, when there was a significant reduction in the number of publications, added to

longer revision wait-times, to articles not related to the virus (Aviv-Reuven and Rosenfeld 2021; Raynaud et al. 2021). Moreover, the tendency of growth in the number of publications is visible in the next years, with 18 articles in 2022 and 17 in 2023, taking in consideration that this review only considers works published until June.

Extraction Step and Selected articles

Data extracted was divided between bacterial and fungal phytopathogens and is displayed in Tables 2 and 3, respectively.

Table 2. Scientific papers about EOs against bacterial phytopathogens in the last five years obtained on *Scopus*. Concentration values expressed as determined by authors. TGI: total growth inhibition; (%): highest growth inhibition reported; MIC – Minimal Inhibitory Concentration; MBC: Minimal Bactericidal Concentration; IC50/90: Inhibitory Concentration for 50/90% of growth.

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Achillea millefolium</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1600 ppm (MIC) and 3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhaliilov (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>		1600 ppm (MIC) and 2880 ppm (MBC)	
<i>Allium sativum</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhaliilov (2022)
<i>Carum copticum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with EO), Well-diffusion and Vapor-phase	1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC) and 16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MBC)	Feizi <i>et al.</i> (2023)
<i>Caryophyllus aromaticum</i>	<i>Xanthomonas</i> sp	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Başaran <i>et al.</i> (2022)
<i>Cedrus deodara</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Agar dilution (paper disk embedded with EO)	100 μL (8-15 mm (zone of inhibition))	Ramadass <i>et al.</i> (2019)
<i>Cinnamomum aromaticum</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	400 ppm (MIC) and 560 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhaliilov (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>		200 ppm (MIC) and 280 ppm (MBC)	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	20-40 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Başaran <i>et al.</i> (2022)
	<i>Xanthomonas</i> sp.		20-40 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	
<i>Cistus ladaniferus</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Agar dilution (paper disk embedded with EO)	0.78 mg.mL ⁻¹ (MIC)	Benali <i>et al.</i> (2020)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>		0.19 mg.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Citrus aurantiifolia</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhaliilov (2022)
<i>Citrus nobilis</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	20 μL (15 -20 mm (inhibition zone))	Mongkol <i>et al.</i> (2020)
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>		20 μL (10 -14 mm (inhibition zone))	

Table 2. (continues)

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Citrus reticulata</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
<i>Cordia curassavica</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Microdilution	500 -1000 µg.mL ⁻¹ (MIC ₁₀₀) and 135 - 474 µg.mL ⁻¹ (MIC ₅₀)	Da Silva <i>et al.</i> (2020)
<i>Croton grewioides</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Microdilution	1000 - 4000 µg.mL ⁻¹ (MIC) and 1000 - > 4000 µg.mL ⁻¹ (MBC)	Rodrigues <i>et al.</i> (2023)
<i>Dysphania ambrosioides</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1000 µg.mL ⁻¹ , lower inhibition when compared to positive control	Zefzoufi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Erwinia amylovora</i>		1000 µg.mL ⁻¹ , inhibition similar to positive control	
	<i>Pseudomonas syringae</i>		1000 µg.mL ⁻¹ , inhibition similar to positive control	
<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
<i>Eryngium triquetrum</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Microdilution	40mg.mL ⁻¹ (85%)	Merad <i>et al.</i> (2021)
	<i>Pseudomonas cichorii</i>		40 mg.mL ⁻¹ (TGI)	
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
<i>Humus lupulus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Microdilution	30 µg.mL ⁻¹ (MIC) and 60 µg.mL ⁻¹ (MBC)	Poleć <i>et al.</i> (2019)
<i>Laurus nobilis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil) and Well-diffusion	1.25% (v/v) (MIC) and 2.5-5% (v/v) (MBC)	Mamoucha <i>et al.</i> (2023)
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1600 ppm (MIC) and 3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>glycinea</i>		1600 ppm (MIC) and 3200 ppm (MBC)	

Table 2. (continues)

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Lippia gracilis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Microdilution	0,7 - 1 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 0,7 -1 mg.mL ⁻¹ (MBC)	da Silva <i>et al.</i> (b) (2019)
<i>Mentha longifolia</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1200 ppm (MIC) and 1520 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>		1600 ppm (MIC) and 2560 ppm (MBC)	
<i>Mentha piperita</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1600 ppm (MIC) and 3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>		1600 ppm (MIC) and 3200 ppm (MBC)	
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	10 mg.mL ⁻¹ (lower inhibition than positive control)	Camele <i>et al.</i> (2021)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>		10 mg.mL ⁻¹ (lower inhibition than positive control)	
	<i>Pseudomonas syringae</i>		10 mg.mL ⁻¹ (similar inhibition to positive control)	
	<i>Xanthomonas campestris</i>		10 mg.mL ⁻¹ (lower inhibition than positive control)	
<i>Mentha spicata</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	12.5 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 15.2 mg.mL ⁻¹ (MBC)	Dozein <i>et al.</i> (2023)
	<i>Rhizobium</i> sp.	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	10-20 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Basaran <i>et al.</i> (2022)
	<i>Xanthomonas</i> sp.		20 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Mentha suaveolens</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Agar dilution (paper disk embedded with EO)	0.78 mg.mL ⁻¹ (MIC)	Benali <i>et al.</i> (2020)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>		0.78 mg.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Nepeta cataria</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Well-diffusion	40% (v/v) lower inhibition than positive control	Patel <i>et al.</i> (2023)
	<i>Pseudomonas syringae</i>		40% (v/v) lower inhibition than positive control	
	<i>Xanthomonas perforans</i>		40% (v/v) lower inhibition than positive control	

Table 2. (continues)

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Oleum calami</i>	<i>Pseudomonas savastanoi pv glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
<i>Oliveria decumbens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Microdilution	0.44 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 6 mg.mL ⁻¹ (MBC)	Khoshbakht <i>et al.</i> (2020)
	<i>Clavibacter michiganensis</i>		0.44 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 4.25 mg.mL ⁻¹ (MBC)	
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>		0.47 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 2 mg.mL ⁻¹ (MBC)	
	<i>Xanthomonas citri</i>		1.25 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 4.5 mg.mL ⁻¹ (MBC)	
<i>Origanum compactum</i>	<i>Allorhizobium vitis</i>	Microdilution	0.015 % (v/v) (MIC) and 0.03% (v/v) (MBC)	Proto <i>et al.</i> (2022)
	<i>Erwinia amylovora</i>		0.03% (v/v) (MIC) and 0.06% (v/v) (MBC)	
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>		0.03% (v/v) (MIC) and 0.125% (v/v) (MBC)	
	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>		0.03% (v/v) (MIC) and 0.03% (v/v) (MBC)	
<i>Origanum heracleoticum</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	Agar dilution (paper disk embedded with EO)	12 mg.mL ⁻¹ (40%)	Pepa <i>et al.</i> (2019)
	<i>Clavibacter michiganensis</i>		12 mg.mL ⁻¹ (80-100%)	
	<i>Xanthomonas campestris</i>		12 mg.mL ⁻¹ (40-60%)	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		12 mg.mL ⁻¹ (40-60%)	
	<i>Pseudomonas syringae</i>		12 mg.mL ⁻¹ (40-60%)	

Table 2. (continues)

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Origanum majorana</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	Agar dilution (paper disk embedded with EO)	12 mg.mL ⁻¹ (<20%)	Pepa <i>et al.</i> (2019)
	<i>Erwinia amylovora</i>	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	5.9 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 12.4 mg.mL ⁻¹ (MBC)	Dozein <i>et al.</i> (2023)
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Agar dilution (paper disk embedded with EO)	12 mg.mL ⁻¹ (40-60%)	Pepa <i>et al.</i> (2019)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		12 mg.mL ⁻¹ (20-40%)	
	<i>Pseudomonas syringae</i>		12 mg.mL ⁻¹ (40-60%)	
	<i>Xanthomonas campestris</i>		12 mg.mL ⁻¹ (<20%)	
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Agar Diffusion (films embed with essential oil)	1000 ppm incorporated (80%)	Elshafie <i>et al.</i> (2020)
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	200 ppm (MIC) and 280 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Well-diffusion	5% (v/v) (inhibition similar to positive control)	Patel <i>et al.</i> (2023)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1600 ppm (MIC) and 3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Agar Diffusion (films embed with essential oil)	1000 ppm incorporated (70%)	Elshafie <i>et al.</i> (2020)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Well-diffusion	10% (v/v) (inhibition similar to positive control)	Patel <i>et al.</i> (2023)
	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Microdilution	136 µg.mL ⁻¹ (IC ₉₀)	Zamuner <i>et al.</i> (2023)
	<i>Xanthomonas perforans</i>	Well-diffusion	10% (v/v) (higher inhibition than positive control)	Patel <i>et al.</i> (2023)
	<i>Xanthomonas phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	Agar Diffusion (films embed with essential oil)	1000 ppm incorporated (62%)	Elshafie <i>et al.</i> (2020)
<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
<i>Salvia officinalis</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	>3200 ppm (MIC) and >3200 (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)

Table 2. (continues)

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Satureja hortensis</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	1.8 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 5 mg.mL ⁻¹ (MBC)	Dozein <i>et al.</i> (2023)
<i>Satureja montana</i>	<i>Allorhizobium vitis</i>	Microdilution	0.03 % (v/v) (MIC) and 0.03% (v/v) (MBC)	Proto <i>et al.</i> (2022)
	<i>Erwinia amylovora</i>		0.06 (v/v) (MIC) and 0.06% (v/v) (MBC)	
	<i>Pseudomonas savatanoi</i>		0.06 (v/v) (MIC) and 0.2% (v/v) (MBC)	
	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>		0.03 (v/v) (MIC) and 0.03% (v/v) (MBC)	
<i>Satureja khuzistanica</i>	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>	Well-diffusion	0.19 g.L ⁻¹ (MIC) and 0.38 g.L ⁻¹ (MBC)	Nouri <i>et al.</i> (2021)
<i>Smyrniolum olusatrum</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Microdilution	40mg.mL ⁻¹ (58%)	Merad <i>et al.</i> (2021)
	<i>Pseudomonas cichorii</i>		40 mg.mL ⁻¹ (70%)	
<i>Solidago canadensis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	20% (v/v) in solution (0-10%)	Elshafie <i>et al.</i> (2019)
	<i>Clavibacter michiganensis</i>		20% (v/v) em solução (10-20%)	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		20% (v/v) em solução (10-20%)	
<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Pseudomonas savastanoi pv glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1200 ppm (MIC) and 1600 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
<i>Trachyspermum ammi</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	3.7 mg.mL ⁻¹ (MIC) and 10 mg.mL ⁻¹ (MBC)	Dozein <i>et al.</i> (2023)

Table 2. (continues)

Essential oil	Target organism	Antibacterial assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Allorhizobium vitis</i>	Microdilution	0.015 % (v/v) (MIC) and 0.03% (v/v) (MBC)	Proto <i>et al.</i> (2022)
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	400 ppm (MIC) and 720 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Erwinia amylovora</i>	Microdilution	0.03% (v/v) (MIC) and 0.06% (v/v) (MBC)	Proto <i>et al.</i> (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	Seed disinfection assay	1.76 mg.mL ⁻¹ (v/v) <i>in vivo</i> , reduced disease incidence in 30%	Sotelo <i>et al.</i> (2021)
		Microdilution	0.125% (v/v) (MIC) and 0.5% (v/v) (MBC)	Proto <i>et al.</i> (2022)
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>glycinea</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	1200 ppm (MIC) and 1440 ppm (MBC)	Tarakanov and Dzhililov (2022)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Seed disinfection assay	1.76 mg.mL ⁻¹ (v/v) <i>in vivo</i> , reduced disease incidence in 30%	Sotelo <i>et al.</i> (2021)
	<i>Rhizobium</i> sp.	Microdilution and Agar dilution (paper disk embedded with EO)	20-10 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Başaran <i>et al.</i> (2022)
	<i>Xanthomonas</i> sp.		10 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Microdilution	0.03% (v/v) (MIC) and 0.06% (v/v) (MBC)	Proto <i>et al.</i> (2022)
<i>Zataria multiflora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Well-diffusion	0.38 g.L ⁻¹ (MIC) and 0.75 g.L ⁻¹ (MBC)	Nouri <i>et al.</i> (2021)
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil)	100 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Abdullahi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Xanthomonas oryzae</i>		100 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Ziziphora clinopodioides</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Agar Diffusion (paper disks embed with essential oil), Well-diffusion and Vapor-phase	1 µL.mL ⁻¹ (MIC) and 8 µL.mL ⁻¹ (MBC)	Feizi <i>et al.</i> (2023)

Table 3. Scientific papers about EOs against fungal phytopathogens in the last five years obtained on *Scopus*. Concentration values expressed as determined by authors. TGI: total growth inhibition; (%): highest growth inhibition reported; MIC – Minimal Inhibitory Concentration; MFC: Minimal Fungicidal Concentration; EC50/90 – Concentration that exhibits 50/90% of effect; IC50/90: Inhibitory Concentration for 50/90% of growth.

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Allium ascalonicium</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct Contact (Poison-food) and Vapor Phase assay	0.01 g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 0.08 g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	El-Alam <i>et al.</i> (2020)
<i>Allium cepa</i>			0.1 g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 2.3 g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	
<i>Allium porrum</i>			1.2 g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 25.6 g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	
<i>Allium sativum</i>			1.6 g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 22.6 g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	
<i>Allium schoenoprasum</i>			0.9 g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 16.9 g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	
<i>Ammoides verticillata</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Agar diffusion (paper disk embedded with EOs onto inoculated agar)	1mL.L ⁻¹ (41%)	Medjahed <i>et al.</i> (2023)
	<i>Fusarium solanum</i>		1mL.L ⁻¹ (53%)	
	<i>Penicillium expansum</i>		1mL.L ⁻¹ (64%)	
<i>Anethum graveolens</i>	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	Direct Contact (Poison-food)	317 mg.L ⁻¹ (EC ₅₀)	Weisany <i>et al.</i> (2019)
<i>Angelica archangelica</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct contact (Poison-food) and Vapor Phase assay	0.3 (seed) - 4.2 (root) g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 0.8 (seed) – 2.2 (root) g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	El-Alam <i>et al.</i> (2020)
<i>Aniba duckei</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.4% (v/v) (TGI)	Gomes <i>et al.</i> (2019)
	<i>Fusarium oxysporum</i>		0.4% (v/v) (TGI)	
<i>Anthriscus cerefolium</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct Contact (Poison-food) and Vapor Phase assay	3.1 g.L ⁻¹ (IC ₅₀) and 5.5 g.L ⁻¹ (IC ₅₀)	El-Alam <i>et al.</i> (2020)
<i>Artemisia annua</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Direct Contact (Poison-food)	4 µL.mL ⁻¹ (TGI)	Kong <i>et al.</i> (2023)
	<i>Fusarium oxysporum</i>		8 µL.mL ⁻¹ (89%)	
	<i>Fusarium solani</i>		8 µL.mL ⁻¹ (79%)	
	<i>Fusarium verticillioides</i>		8 µL.mL ⁻¹ (79%)	

Table 3 (continues).

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Artemia herba alba</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Agar diffusion (paper disk embedded with EOs onto inoculated agar)	1mL.L ⁻¹ (54%)	Medjahed <i>et al.</i> (2023)
	<i>Fusarium solanum</i>		1mL.L ⁻¹ (42%)	
	<i>Penicillium expansum</i>		1mL.L ⁻¹ (23%)	
<i>Baccharis articulata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Direct Contact (Poison-food)	1.54 µL.mL ⁻¹ (IC ₅₀)	Tomazoni <i>et al.</i> (2019)
<i>Baccharis ochracea</i>			2.83 µL.mL ⁻¹ (IC ₅₀); 10 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Baccharis psiadioides</i>			10 µL.mL ⁻¹ (IC ₅₀)	
<i>Baccharis trimera</i>			1.23 µL.mL ⁻¹ (IC ₅₀); 5 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Ballota hirsute</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-food) and Vapor Phase assay	160ppm (EC ₅₀); 2000 ppm (MIC); >2000 ppm (MFC) and 90 ppm (EC ₅₀); 1000 ppm (MIC and MFC)	Ou-Ani <i>et al.</i> (2023)
	<i>Penicillium expasum</i>		210 ppm (EC ₅₀); 2000 ppm (MIC); >2000 ppm (MFC) and 150 ppm (EC ₅₀); 2000 ppm (MIC); >2000 ppm (MFC)	
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Agar diffusion (paper disks embed with EOs on inoculated agar) and Vapor Phase assay	400 g.Kg ⁻¹ incorporate in film, with higher inhibition than negative control	Martins <i>et al.</i> (2022)
	<i>Fusarium oxysporum</i>		300 g.Kg ⁻¹ incorporated in film (TGI)	
<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Agar diffusion (paper disks embed with EOs on inoculated agar)	2,5 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Dong <i>et al.</i> (2019)
<i>Cinnamomum tamala</i>	<i>Bipolaris australiensis</i>	Direct Contact (Poison-food) and Vapor Phase assay	500 ppm (MIC) and 6.5 µ/petri dish (TGI)	Bisht <i>et al.</i> (2021)
	<i>Choanephora cucurbitarum</i>		400 ppm (MIC) and 5 µ/petri dish (TGI)	
	<i>Rhizoctonia solani</i>		450 ppm (MIC) and 5 µ/petri dish (TGI)	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Cinnamom zeylanicum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ emulsion and nanoemulsion (TGI)	Naserzadeh <i>et al.</i> (2019)
	<i>Phytophthora colocasiae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.625 mg.mL^{-1} (TGI)	Hong <i>et al.</i> (2021)
	<i>Rhizopus stolonifera</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ emulsion and nanoemulsion (TGI)	Naserzadeh <i>et al.</i> (2019)
<i>Citrus aurantium spp. Bergamia</i>	<i>Alternaria solani</i>	Direct Contact (Poison-Food)	2500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (68%)	Hendges <i>et al.</i> (2020)
<i>Citrus nobilis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Vapor Phase assay	20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (63%) (peel) and 20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (44%) (leaf)	Mongkol <i>et al.</i> (2020)
	<i>Curvularia lunata</i>		20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (82%) (peel) and 20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (80%) (leaf)	
	<i>Fusarium sacchari</i>		20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (86%) (peel) and 20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (74%) (leaf)	
	<i>Phytium sp.</i>		5 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (TGI) (peel) and 20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (TGI) (leaf)	
	<i>Rhizoctonia solani</i>		20 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (TGI) (peel) and 10 $\mu\text{L}/\text{disk}$ (TGI) (leaf)	
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	400-800 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (27%)	Morkeliūnė <i>et al.</i> (2021)
	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.46 ~ 0.53 g.L^{-1} (IC ₅₀) (aerial parts and seeds)	Raveau <i>et al.</i> (2022)
	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Microdilution Assay	0.001 ~ 0.08 g.L^{-1} (IC ₅₀) (aerial parts and seeds)	
<i>Corymbia citriodora</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Seed Disinfection Assay	4mL of solution at 700 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ per kg of seeds	Baiotto <i>et al.</i> (2023)
	<i>Penicillium rubens</i>		4mL of solution at 700 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ per kg of seeds	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Alternaria linariae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	2000 ppm (TGI)	Salto-Rezabala <i>et al.</i> (2022)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Microdilution Assay (Conidia germination) of non-encapsulated and encapsulated EOs	0.025% (v/v) (MIC) (non-encapsulated) and 0.1% (v/v) (MIC) (encapsulated EOS)	Antonioli <i>et al.</i> (2020)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		0.025% (v/v) (MIC) (non-encapsulated) and 0.1% (v/v) (MIC) (encapsulated EOS)	
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	105.88 ppm (EC ₅₀)	Hoseini <i>et al.</i> (2019)
	<i>Fusarium sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) (TGI)	Tico <i>et al.</i> (2019)
	<i>Paramyrothecium roridum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.6 µL.mL ⁻¹ (TGI)	Macedo <i>et al.</i> (2020)
	<i>Rhizoctonia Solani</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0,25% (v/v) (TGI)	Dias <i>et al.</i> (2021)
<i>Cymbopogon nardus</i>	<i>Alternaria solani</i>	Direct Contact (Poison-Food)	2000 µL.L ⁻¹ (TGI)	Hendges <i>et al.</i> (2023)
<i>Cymbopogon winterianus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1.5 µL.mL ⁻¹ (TGI)	Peixoto <i>et al.</i> (2023)
<i>Daucus carota</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) in solution, with higher inhibition rates than negative control	Angelini <i>et al.</i> (2022)
	<i>Monilinia fructigena</i>			
<i>Dracocephalum heterophyllum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	5 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Chander <i>et al.</i> (2023)
	<i>Fusarium oxysporum</i>			
	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	228 µg.mL ⁻¹ (IC ₅₀)	Zefzoufi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium oxysporum</i>		123 µg.mL ⁻¹ (IC ₅₀)	
	<i>Verticillium dahlia</i>		176 µg.mL ⁻¹ (IC ₅₀)	
<i>Eucalyptus citriodora</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) (60%)	Tico <i>et al.</i> (2019)
<i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus. urophylla</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	10 mg.mL ⁻¹ (TGI)	Zhou <i>et al.</i> (2021)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>		20 mg.mL ⁻¹ (TGI)	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		10 mg.mL ⁻¹ (TGI)	
	<i>Fusarium graminearum</i>		40 mg.mL ⁻¹ (TGI)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>		20 mg.mL ⁻¹ (TGI)	
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		20 mg.mL ⁻¹ (TGI)	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (TGI)	Pedrotti <i>et al.</i> (2022)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Direct Contact (Poison-Food)	< 500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC)	Oliveira <i>et al.</i> (2019)
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) (TGI)	Tico <i>et al.</i> (2019)
<i>Fortunella margarita</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	100 μL (89%)	Menezes Filho & Castro (2019)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		100 μL (83%)	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		100 μL (TGI)	
<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (TGI)	Morkeliūnė <i>et al.</i> (2021)
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (28%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		10 mg/disk (64%)	
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Alternaria spp.</i>	Direct Contact (Poison food)	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, considered to be of moderate effect by author	Lukošiūtė <i>et al.</i> (2020)
	<i>Botrytis cinerea</i>		1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, considered to be of moderate effect by author	
	<i>Colletotrichum spp.</i>		1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, considered to be of moderate effect by author	
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	49.76 ppm (EC_{50})	Hoseini <i>et al.</i> (2019)
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (37%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		10 mg/disk (86%)	
<i>Laurus nobilis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison food)	2000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC)	Šernaitė <i>et al.</i> (2020)
<i>Lippia alba</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Direct Contact (Poison food) and Vapor-Phase	400-500 ppm (MIC) (contact) and 5 $\mu\text{L}/\text{plate}$ (TGI) (vapor)	Saroj <i>et al.</i> (2019)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Direct Contact (Poison-Food) and Vapor-Phase	62.5 ~ 125 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC) (contact) and >500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC) (vapor)	Oliveira <i>et al.</i> (2019)
<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Direct Contact (Poison food)	30 mL.L^{-1} (TGI)	Zatla <i>et al.</i> (2020)
	<i>Botrytis cinerea</i>		30 mL.L^{-1} (98%)	
	<i>Penicillium expansum</i>		30 mL.L^{-1} (96%)	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Alternaria linariae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1981 ppm (EC ₅₀)	Salto-Rezabala <i>et al.</i> (2022)
	<i>Alternaria solani</i>	Direct Contact (Poison-Food)	4473 µL.L ⁻¹ (MIC)	Hendges <i>et al.</i> (2021)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	3.57 µL.mL ⁻¹ (IC ₅₀); 2.58 µL.mL ⁻¹ (IC ₉₀)	Peixoto <i>et al.</i> (2023)
	<i>Phytophthora colocasiae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	2.5 mg.mL ⁻¹ (TGI)	Zhang <i>et al.</i> (2023)
<i>Mentha aquatica</i>	<i>Botrytis cineria</i>	Direct Contact (Poison-Food)	5000 ppm (TGI)	Weisany <i>et al.</i> (2022)
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>			
<i>Mentha arvensis</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Agar diffusion (paper disks embed with EOs on inoculated agar)	20 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Dong <i>et al.</i> (2019)
<i>Mentha piperita</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Direct Contact (Poison-Food)	5.40 mg.mL ⁻¹ (MFC)	Camele <i>et al.</i> (2021)
	<i>Botrytis cinerea</i>		2.91 mg.mL ⁻¹ (MFC)	
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 µL.L ⁻¹ (36%)	Morkeliūnė <i>et al.</i> (2021)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.2% (v/v) (TGI)	Reyna <i>et al.</i> (2022)
	<i>Monilinia fructicola</i>	Direct Contact (Poison-Food)	4.78 mg.mL ⁻¹ (MFC)	Camele <i>et al.</i> (2021)
	<i>Penicillium expansum</i>		4.98 mg.mL ⁻¹ (MFC)	
<i>Mentha pulegium</i>	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (72%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		10 mg/disk (TGI)	
<i>Mentha spicata</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1.25% (v/v) (TGI)	Soliman <i>et al.</i> (2022)
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (92%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		10 mg/disk (TGI)	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Mentha longifolia</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Direct Contact (Poison-Food)	400 µg.mL ⁻¹ (62%)	Verdeguer <i>et al.</i> (2020)
	<i>Botryotinia fuckeliana</i>		400 µg.mL ⁻¹ (69%)	
	<i>Curvularia hawaiiensi</i>		400 µg.mL ⁻¹ (60%)	
	<i>Fusarium equiseti</i>		400 µg.mL ⁻¹ (80%)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) (TGI)	Soliman <i>et al.</i> (2022)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	400 µg.mL ⁻¹ (93%)	Verdeguer <i>et al.</i> (2020)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		400 µg.mL ⁻¹ (56%)	
	<i>Verticillium dahliae</i>		300 µg.mL ⁻¹ (TGI)	
<i>Monarda didyma</i> <i>Murraya paniculata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Agar Diffusion (droplets added to agar surface around mycelia)	2 µL (TGI)	Christova <i>et al.</i> (2021)
	<i>Diaporthe nobilis</i>		2 µL (TGI)	
	<i>Phytophthora plurivora</i>		1 µL (TGI)	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Agar Diffusion (EOs spread over agar surface before mycelia placement)	300 µL (91%)	Da Silva <i>et al.</i> (a) (2019)
<i>Myrcia ovata</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.03 µL.mL ⁻¹ (MIC)	White <i>et al.</i> (2019)
	<i>Plenodomus destruens</i>		0.05 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
	<i>Thielaviopsis paradoxa</i>		0.03 µL.mL ⁻¹ (MIC)	
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) (TGI)	Tico <i>et al.</i> (2019)
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (58%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		10 mg/disk (TGI)	
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Agar diffusion (paper disks embed with EOs on inoculated agar) followed by <i>in vivo</i> assay	20 µL.mL ⁻¹ (MIC)	Dong <i>et al.</i> (2019)

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Origanum heracleoticum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Direct Contact (Poison-Food)	500 ppm (TGI)	Pepa <i>et al.</i> (2019)
	<i>Botrytis cinerea</i>		500 ppm (TGI)	
	<i>Monilinia fructicola</i>		500 ppm (TGI)	
	<i>Penicillium expansum</i>		1000 ppm (TGI)	
<i>Origanum manjorana</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Vapor Phase assay	2000 ppm (60-80%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Monilinia fructicola</i>		2000 ppm (60-80%)	
	<i>Penicillium expansum</i>		2000 ppm (60-80%)	
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>		10 mg/disk (37%)	
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Well-Diffusion and Microdilution	0.2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Krumova <i>et al.</i> (2021)
	<i>Alternaria alternata</i>	Direct Contact (Poison-Food)	0.005 ~ 0.02 (w/v) when encapsulated (MIC)	Yilmaz <i>et al.</i> (2019)
	<i>Alternaria solani</i>	Well-Diffusion and Microdilution	0.4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Krumova <i>et al.</i> (2021)
	<i>Aspergillus flavus</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 ppm incorporated in hydrogel (53%)	Elshafie <i>et al.</i> (2020)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Well-Diffusion and Microdilution	0.4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Krumova <i>et al.</i> (2021)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	140.04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₅₀)	Hou <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 ppm incorporated in hydrogel (68%)	Elshafie <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Well-Diffusion and Microdilution	0.4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Krumova <i>et al.</i> (2021)
	<i>Fusarium solani</i>		0.4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	
	<i>Neocosmospora keratoplastica</i>		0.8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	
	<i>Penicillium expansum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 ppm incorporated in hydrogel (63%)	Elshafie <i>et al.</i> (2020)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		1000 ppm incorporated in hydrogel (59%)	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		1000 ppm incorporated in hydrogel (45%)	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Direct Contact (Poison-Food) and Vapor Phase	0.39 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC); 0.78 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MFC)	Cibanal <i>et al.</i> (2022)

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Direct Contact (Poison-Food) and Vapor Phase	250 ~ 500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC)	Oliveira <i>et al.</i> (2019)
<i>Piper aduncum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Disk Diffusion (incorporated film placed onto inoculated plate)	0,75% incorporated (No growth on film)	Valadares <i>et al.</i> (2020)
	<i>Rhizopus microsporus</i>		1% incorporated (No growth on film)	
<i>Piper nigrum</i>	<i>Botrydiploidia theobromae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	6.25 mg.mL^{-1} (MIC)	Nie <i>et al.</i> (2023)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		6.25 mg.mL^{-1} (MIC)	
<i>Psidium guajava</i>	<i>Curvularia lunata</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1% (v/v) (86%)	Chaturvedi <i>et al.</i> (2021)
	<i>Fusarium chlamydosporum</i>		1% (v/v) (83%)	
	<i>Rhizoctonia solani</i>		1% (v/v) (40%)	
<i>Psidium myrtoides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Direct Contact (Poison-Food)	450 mg.mL^{-1} (76%)	Dias <i>et al.</i> (2022)
<i>Pogostemon cablin</i>	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (25%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		-	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Seed Disinfection Assay	4mL of solution at 700 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ per kg of seeds	Baiotto <i>et al.</i> (2023)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with lower inhibition rates than positive control	Karadağ <i>et al.</i> (2022)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	2000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC)	Šernaitė <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Direct Contact (Poison-Food)	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with lower inhibition rates than positive control	Karadağ <i>et al.</i> (2022)
	<i>Fusarium culmorum</i>		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with lower inhibition rates than positive control	
	<i>Penicillium rubens</i>	Seed Disinfection Assay	4mL of solution at 700 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ per kg of seeds	Baiotto <i>et al.</i> (2023)
<i>Santolina pectinata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	Manssouri <i>et al.</i> (2022)
	<i>Penicillium expansum</i>		1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC)	
	<i>Rhizopus stolonifer</i>		2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (57%)	
<i>Salvia lavandulaefolia</i>	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	10 mg/disk (59%)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		10 mg/disk (73%)	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Salvia officinalis</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (19%)	Morkeliūnė <i>et al.</i> (2021)
	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	105.88 ppm (EC ₅₀)	Hoseini <i>et al.</i> (2019)
<i>Salvia pachystachya</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Bioautography	80 - 160 μg , with lower inhibition when compared to positive control	Tabanca <i>et al.</i> (2019)
	<i>Colletotrichum fragariae</i>			
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			
<i>Salvia sclarea</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1.47 ~ 2.08 g.L^{-1} (IC ₅₀) (aerial parts and seeds)	Raveau <i>et al.</i> (2022)
	<i>Phytophthora colocasiae</i>	Direct Contact (Poison-Food)	5 mg.mL^{-1} (TGI)	Zhang <i>et al.</i> (2023)
	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Microdilution Assay	0.001 ~ 0.08 g.L^{-1} (IC ₅₀) (aerial parts and seeds)	Raveau <i>et al.</i> (2022)
<i>Satureja horvatii</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Well Diffusion, Direct Contact (Poison-Food) and Vapor-Phase	100 $\mu\text{L.L}^{-1}$ air (TGI) (vapor) and 18.2 μL /plate (ED ₅₀)	Yfanti <i>et al.</i> (2021)
	<i>Botrytis cinerea</i>		100 $\mu\text{L.L}^{-1}$ air (91%) (vapor) and 286 μL /plate (ED ₅₀)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>		123 $\mu\text{L.L}^{-1}$ air (TGI) (vapor) and 4.4 μL /plate (ED ₅₀)	
<i>Satureja montana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Direct Contact (Poison-Food)	400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (62%)	Verdeguer <i>et al.</i> (2020)
	<i>Botryotinia fuckeliana</i>		400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (69%)	
	<i>Curvularia hawaiiensi</i>		400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (60%)	
	<i>Fusarium equiseti</i>		400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (80%)	
	<i>Fusarium oxysporum</i>		400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (93%)	
	<i>Rhizoctonia solani</i>		400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (56%)	
	<i>Verticillium dahliae</i>		300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (TGI)	
<i>Satureja hortensis</i>	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase assay	2,5 mg/disk (TGI)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		2,5 mg/disk (TGI)	
<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison-Food)	1200 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (MIC)	Šernaitė <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food)	120 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (TGI)	Andrade-Hoyos <i>et al.</i> (2022)
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	5000 ppm (82%)	Hashem <i>et al.</i> (2023)
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Direct Contact (Poison-Food)	300 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (TGI)	Andrade-Hoyos <i>et al.</i> (2022)
<i>Solidago canadensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Direct Contact (Poison-Food) and Microdilution	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (< 20%)	Elshafie <i>et al.</i> (2019)
	<i>Botrytis cinerea</i>		- / -	
	<i>Monilinia fructicola</i>		1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (60-80%) and 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIC)	
	<i>Penicillium expansum</i>		1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (20-40%)	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Teucrium luteum</i> subsp. <i>flavovirens</i>	<i>Alternaria sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food) and Vapor-Phase	2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (86%) and 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (TGI)	Znini <i>et al.</i> (2021)
	<i>Penicillium expansum</i>		2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (83%) and 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (87%)	
	<i>Rhizopus stolonifer</i>		2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (71%) and 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (81%)	
<i>Thya plicata atrovirens</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Direct contact (Poison-food) and Vapor-Phase	3.6 g.L^{-1} (IC_{50}) and 9.5 g.L^{-1} (IC_{50})	El-Alam <i>et al.</i> (2020)
<i>Thymus convolutus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Vapor-Phase	5.32 $\mu\text{L/ar}$ (LC_{50})	Aksit <i>et al.</i> (2022)
	<i>Phytophthora infestans</i>		0.331 $\mu\text{L/ar}$ (LC_{50})	
	<i>Rhizoctonia solani</i>		0.339 $\mu\text{L/ar}$ (LC_{50})	
<i>Thymus daenensis</i>	<i>Colleotrichum nymphaeae</i>	Direct Contact (Poison-food)	172.8 mg.L^{-1} (EC_{50})	Weisany <i>et al.</i> (2019)
<i>Thymus pectinatus</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	Vapor-Phase	0.452 $\mu\text{L/ar}$ (LC_{50})	Aksit <i>et al.</i> (2022)
	<i>Rhizoctonia solani</i>		0.467 $\mu\text{L/ar}$ (LC_{50})	

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Alternaria linariae</i>	Direct Contact (Poison-Food) followed by conidia germination and <i>in vivo</i> assays	2000 ppm (TGI)	Salto-Rezabala <i>et al.</i> (2022)
	<i>Alternaria spp.</i>	Direct Contact (Poison food)	400 µg.mL ⁻¹ , considered to be effect by author	Lukošiūtė <i>et al.</i> (2020)
	<i>Botrytis allii</i>	Vapor-Phase	2.193 µL.cm ³ (TGI)	Gheorghe <i>et al.</i> (2022)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Direct Contact (Poison food)	400 µg.mL ⁻¹ , considered to be effect by author	Lukošiūtė <i>et al.</i> (2020)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Direct Contact (Poison-Food)	200 µL.L ⁻¹ (TGI)	Morkeliūnė <i>et al.</i> (2021)
	<i>Colletotrichum capsici</i>	Direct Contact (Poison food)	0.25 mg.mL ⁻¹ (TGI)	Arora <i>et al.</i> (2023)
	<i>Colletotrichum spp.</i>	Direct Contact (Poison food)	400 µg.mL ⁻¹ , considered to be effect by author	Lukošiūtė <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium graminearum</i>	Vapor-Phase	0.439 µL.cm ³ (TGI)	Gheorghe <i>et al.</i> (2022)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Direct Contact (Poison food)	0.5 mg.mL ⁻¹ (TGI)	Arora <i>et al.</i> (2023)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Vapor-Phase	-	Aksit <i>et al.</i> (2022)
	<i>Fusarium sp.</i>	Direct Contact (Poison-Food)	300 µL.L ⁻¹ (TGI)	Andrade-Hoyos <i>et al.</i> (2022)
	<i>Phytophthora infestans</i>	Vapor-Phase	0.346 µL/ar (LC ₅₀)	Aksit <i>et al.</i> (2022)
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Direct Contact (Poison-Food)	300 µL.L ⁻¹ (TGI)	Andrade-Hoyos <i>et al.</i> (2022)
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Direct Contact (Poison food)	0.75 mg.mL ⁻¹ (TGI)	Arora <i>et al.</i> (2023)
	<i>Pythium ultimum</i>	Vapor-Phase	0.244 µL.cm ³ (TGI)	Gheorghe <i>et al.</i> (2022)
	<i>Raffaelea quercus-mongolicae</i>	Vapor Phase	2,5 mg /disk (TGI)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Vapor-Phase	0.459 µL/ar (LC ₅₀)	Aksit <i>et al.</i> (2022)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Vapor Phase	2,5 mg/disk (TGI)	Kim <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Vapor-Phase	0.054 µL.cm ³ (TGI)	Gheorghe <i>et al.</i> (2022)
<i>Tagetes patula</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Well-Diffusion	50 µg.mL ⁻¹ (MIC)	Villada-Ramos <i>et al.</i> (2021)

Table 3. (continues)

Essential oil	Target organism	Antifungal Assay	Reported Inhibitory Concentration	Reference
<i>Vepris macrophylla</i>	<i>Alternaria solani</i>	Direct Contact (Poison food)	800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (73%)	Giamperi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium avenaceum</i>		130.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIC); 390 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MFC)	
	<i>Fusarium graminearum</i>		215 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIC)	
	<i>Fusarium poae</i>		300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIC)	
	<i>Fusarium semitectum</i>		800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (78%)	
	<i>Phytophthora cryptogea</i>		130 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIC); 390 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MFC)	
<i>Zingiber officinale</i>	<i>Colletotrichum falcatum</i>	Direct Contact (Poison food)	1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC); 1.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₅₀); 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₉₀)	Abdullahi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Fusarium oxysporum</i>		1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC); 1.3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₅₀); 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₉₀)	
	<i>Ganoderma boninense</i>		1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC); 2.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₅₀); 6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₉₀)	
	<i>Phytophthora colocasiae</i>	Direct Contact (Poison food)	1250 ppm (TGI)	Kalhero <i>et al.</i> (2022)
	<i>Pyricularia oryzae</i>	Direct Contact (Poison food)	1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC); 2.8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₅₀); 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₉₀)	Abdullahi <i>et al.</i> (2020)
	<i>Rigidoporus microporus</i>		1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (MIC); 3.5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₅₀); 6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (LC ₉₀)	
Zedoary tumeric Oil (a mixture of <i>Curcuma phaeocaulis</i> , <i>Curcuma kwangiensis</i> and <i>Curcuma wenyujin</i>)	<i>Phytophthora capsici</i>	Microdilution	7.10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₉₀)	Wang <i>et al.</i> (2019)
	<i>Phytophthora infestans</i>		34.28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₉₀)	
	<i>Phytophthora parasitica</i>		42.13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₉₀)	
	<i>Phytophthora sojae</i>		12.40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₉₀)	
	<i>Pythium aphanidermatum</i>		4.79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₉₀)	
	<i>Pythium ultimum</i>		1789.57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (EC ₉₀)	

Discussion

Plants and their secondary metabolites have been an area of study by scientists throughout the years due to their vast diversity and array of applications. Products of a million-year evolutive processes, secondary metabolites are essential tools in the relationship between plants and their environment (Sharifi-Rad et al. 2017). Among them, we highlight EOs, the study object of this review. Approximately 3000 EOs have already been described, and 300 are widely used as aromatizers and flavorings in the cosmetic and food industry (Burt 2004; Ríos 2015).

Besides their application as fragrances, the potential of EOs as antimicrobial agents has already been explored, with significant applications in the industry as food preservatives (Ríos 2015; Angane et al. 2022). Furthermore, the impact of EOs in human health is a recurrent study subject, initially as part of traditional medicinal knowledge or part of alternative well-being techniques, such as aromatherapy, and more recently as active ingredients against pathogenic bacteria, a subject explored by Valdivieso-Ugarte *et al.* (2019) in their systematic review. Distinctively, here, we discuss the applicability of these substances in the control of phytopathogens of agricultural importance, exploring EOs' potential as biopesticides.

In this context, we highlight efforts such as from De Clerck et al. (2020), in which the publication evaluates 90 EOs against ten phytopathogens. Many of the microorganisms targeted in the study are well-known phytopathogenic fungi responsible for pre- and post-harvest damage in a diverse array of crops, such as members of the genera *Colletotrichum*, *Botrytis*, and *Penicillium*, that are addressed in 35 (37,63%) studies in this review. Similarly, a study published by Rozwalka *et al.* (2020) evaluated 26 EOs against *Sphaceloma ampelinum* and *Pseudocercospora vitis*, phytopathogens that cause anthracnose and grapevine leaf spot, respectively, the most relevant fungal diseases in grapes production in Brazil. These studies

are worth reading and are not present in the data table only due to the extensive volume of data in each. Nevertheless, both works were considered as selected in the extraction process and data was taken in consideration in the writing of this review.

In the following sections, we discuss the applications of EOs as antimicrobial agents against fungal and bacterial phytopathogens separately. This choice allowed a better understanding of the main microbial targets and the techniques applied in the research.

Essential oils as antibacterial agents

From 93 selected articles, 25 (26,88% of accepted works) debate EOs as control agents against bacterial phytopathogens, with the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* being the most common targets of these studies, most likely due to their wide range of host plants. In the case of *Pseudomonas*, over than 60 pathovars have been identified, and while most have a narrow host range, species like *P. syringae* pv. *syringae* can affect over 80 plant species (Córdova et al. 2023). Similarly, the *Xanthomonas* genus, a group known for affecting about 350 plant species, is also classified based on their host range (pathovars), although in the last decades efforts are being made to reclassify the Xanthomonads as subspecies (Schaad et al. 2006; Marin et al. 2019).

Most of studies reviewed rely on known indexes, such as MIC or MBC, obtained through microdilution techniques. Works, such as Zamuner *et al.* (2023), used the resazurin dye as a respiration indicator for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tested against *Origanum vulgare* EO. Others, like Rodrigues *et al.* (2023), used optical density values as a growth indicator for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, against *Croton grewoides* EO extracted from plants from different locations. Usually, these assessments are paired with bactericidal assays, such as Nouri et al. (2021), that transferred the microdilution contents to new medium agar petri dishes to

evaluate *Pectobarium carotovorum* subsp. *carotovorum* survivability after exposure to nano emulsions of *Thymus vulgaris* and *Satureja khuzistanica* EOs.

In the same work, Nouri *et al.* (2021) use a complementary well-diffusion method to assess antibacterial activity of the EOs. Such diffusion techniques, like disc diffusion, while not suitable for determining MIC values, due to uncertainty on the actual concentration of the EO is evenly diffused into or onto agar surface (Balouiri *et al.* 2016), are still present in recent studies as a method to determine resistant or susceptible bacteria (Pepa *et al.* 2019; Abdullahi *et al.* 2020; Mongkol *et al.* 2020; Camele *et al.* 2021; Başaran *et al.* 2022; Proto *et al.* 2022; Tarakanov and Dzhililov 2022; Dozein *et al.* 2023; Feizi *et al.* 2023). Even if not quantitatively efficient, diffusion methods are still used in antibacterial testing due to their simplicity, low cost, output, and easiness of interpreting the results obtained (Balouiri *et al.* 2016). Therefore, we suggest that the use of microdilution techniques, paired with accessory techniques, such as the ones listed previously in this work, can establish a similar output of data between published research, allowing for an easier comparison of the antibacterial action of EOs.

Regarding the EOs evaluated against phyto bacteria, the most recurrent are those from known herbs and spices, with the genus *Origanum* being the most common among the papers analyzed. The antibacterial effect of *Origanum* species usually is associated with the high concentrations of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol), a phenolic monoterpene with antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory already described (Patel *et al.* 2023). The molecule is usually present as major component in most species of the genus, even in samples from different regions: *O. vulgare*, 61 to 71% (Tarakanov and Dzhililov 2022; Patel *et al.* 2023; Zamuner *et al.* 2023) and *O. compactum*, 48% (Proto *et al.* 2022); *O. heracleotium*, 77% (Pepa *et al.* 2019), with only *O. majorana* presenting lower concentrations of Carvacrol (0.6%) with major components

being Terpine-4-ol (29%) and δ -2-Carene (20%) (Pepa et al. 2019). Carvacrol and its isomer Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) are also present in the *Thymus vulgaris*, *Satureja montana*, and *Carum copticum* species, with Thymol being higher in concentrations in some species (Sotelo et al. 2021; Proto et al. 2022; Feizi et al. 2023).

Most works discussed here use EOs from known plant species, herbs, and spices such as *Origanum*, *Thymus*, *Mentha*, *Citrus*, and *Cinnamomum*, among others, and due to well-described compositions and activities, authors usually explored their action further, such as in complex formulations. A hydrogel containing *O. vulgare* EO (at 1000ppm) proposed by Elshafie *et al.* (2020) to control the fungal and antibacterial infestation of *Phaseolus vulgaris* seeds, showed promising results against *Clavibacter michiganensis* and *Xanthomonas phaseoli*. Similarly, Sotelo *et al.* (2021) applied nanoemulsions of *Thymus vulgaris* (at 1.76 mg.mL⁻¹ of EO) in *Glycine max* seeds infected with *Pseudomonas syringae* and reported that the EO nanoemulsion was able to reduce the number of bacteria on seeds without reducing germination.

On the other hand, some authors investigate EOs of less known or regional plant species. The EO from specimens of *Ziziphora clinopodioides*, a traditional medicinal plant collected in Iran, majorly composed of Pulegone (23%) and 1,9-cineole (20%), was able to reduce the growth of *P. syringae* pv. *syringae* in both disc and well diffusion methods, as well as in vapor phase tests (Feizi et al. 2023). Benali *et al.* (2020) revealed that the EO of *Cistus ladanifer*, a Moroccan flower, had a MIC of 0.78 mg.mL⁻¹ for *C. michiganensis* and 0.19 mg.mL⁻¹ for *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, and its major component is Viridiflorol (28%). Results such as these indicate that while the research with already well known EOs may facilitate the development of formulations for more elaborated applications, the investigation of less known species may render promising results in the search for active substances.

Essential oils as antifungal agents

Concerning the fungal phytopathogens, this review search resulted, after the selection step, in 72 papers (77,41% of the total works selected), a number not complementary to the papers regarding bacterial phytopathogens (93 total), due to some works relating results for both fungi and bacteria. Nevertheless, most works presented here have fungal phytopathogens as their target, a tendency explained by the wide range of plant diseases caused by fungal genera. Fungi alone are responsible for 20% of losses in crop yields, with some species causing up to 100% of losses in some agricultural products (Savary et al. 2019; Davies et al. 2021). In addition, fungal phytopathogens are known for continuously affecting cultures post-harvest, leading to subsequent losses along the whole food production chain (Fisher et al. 2018).

Among all species addressed in this review, including both fungi and bacteria, the genus *Fusarium* is the most abundant in number of publications, with a total of 27 (29,03%) papers relating the use of EOs against species from the genus. With over 300 phylogenetic distinct species described, the genus is linked to a myriad of plant diseases. Species like *Fusarium oxysporum*, known for affecting over 100 different host-plants, and *Fusarium graminearum*, responsible for considerable losses to all cereal species worldwide, have already been listed as top 10 phytopathogens (Dean et al. 2012). Apart from damaging crops yield, members of the *Fusarium* genus produces mycotoxins, that could be aggravated by post-harvest contaminations, leading to serious risks to animal feed or human consumption (Dean et al. 2012; Summerell 2019).

The second most common genus in the review was *Colletotrichum* with a total of 21 (22,58%) papers the use of EOs against the fungi known to cause the anthracnose disease. Nonetheless, the *Colletotrichum* genus is considered one of the most damaging groups, affecting a wide variety of plants, especially fruit cultivated in tropical and subtropical regions (Dean et al.

2012). In addition, *Colletotrichum* species are a model organism for host/parasite and infection studies, as well as research in the genetics of phytopathogens, which can explain this genus' relevance in the last five years, regarding control with EOs (Cannon et al. 2012).

Regarding the techniques applied to evaluate fungal strains, likewise to articles about bacterial pathogens, a single technique is preferred among authors. In this case, the Poison Food (PF) technique, based on the dilution of EO into molten agar plates followed by inoculation of agar plugs with mycelia after cooldown, is applied in 55 papers (76,38% of fungal pathogen works in this review). This technique, described by Ramadas *et al.* (1998), allows the identification of “poisonous” compounds (the EOs, in this case) when there is reduced mycelial growth when compared to a negative control group (Sridhar et al. 2003). Comparably to other diffusion methods, like disc diffusion and spread techniques above agar, the poison food technique is a simple, easy-to-read, and affordable assay that while not suitable for MIC calculations, can detect a compound that affects fungal growth.

Nonetheless, the PF technique allows the evaluation of different fungal species, with the only apparent limiting factor being the fungal ability to grow on culture media. Since fungi are a diverse group, with different reproductive structures and strategies, a generalist approach, while not addressing all effects of antimicrobial agent may have on the phytopathogen and its structures, may circumvent the species specificities, and allow for a uniform result. For example, examination of sporangia formation and spore germination of *Phytophthora colocasiae* after treatments with *Zingiber officinale* EO, as reported by Kalhoro *et al.* (2022), while offering valuable insight on how the EO can affect the morphology of sporangia and the spores, could not be applied for testing species that have poor sporulation or are non-sporulating in growth media. Moreover, the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) published a standardized microdilution

method for filamentous fungi, but likewise the bacterial testing methods, microdilutions are expensive, time consuming, and may be less accessible than commercial options (Linares et al. 2005) or diffusion techniques like PF.

Regarding the EOs evaluated, a similar trend was observed when compared to works targeting bacterial phytopathogens regarding well and less known EOs. About 17% (9) of works about fungal phytopathogens studied EOs from the genus *Thymus*, followed by 8 (8,6%) papers relating EOs from both *Cymbopogon* and *Mentha* genus. The antifungal effects of *T. vulgaris* were assessed in a diversity of techniques against various targets, PF assays against *C. capsici*, *Phytophthora aphanidermatum*, and *Fusarium oxysporum*, completing inhibiting mycelial growth in concentrations ranging from 0.25 to 0.75 mg.mL⁻¹ (Arora et al. 2023). The volatile components of *T. vulgaris* and their fumigant effect against *Rhizoctonia solani* (2 µL per disc), *Phytophthora infestans* (2 µL per disc), and *Fusarium oxysporum* (1 µL per disc), were investigated by Aksit *et al.* (2022) by affixing a paper disc in the lids of petri dishes. The nanoencapsulation of *T. daenensis* in copper nanoparticles showed a significant effect in reducing conidia germination of *C. nymphaeae* (96% at 600ppm of EO), enhancing the inhibition effects of the EO alone (85% inhibition with 1000ppm), as reported by Weisany *et al.* (2019).

As stated in the previous section, while the use of well-known EOs seems to be a publishing trend, some authors offer valuable insight in less-known species. Giamperi *et al.* (2020) described the use of *Vepris macrophylla*, a plant of the Rutaceae family, endemic to Madagascar and used in traditional medicine against the species of *Fusarium*, and *P. cryptogea*. Using a PF technique, the author determined the MIC for *F. avenaceum* (130 µg.mL⁻¹), *F. poae* (300 µg.mL⁻¹), *F. graminearum* (215 µg.mL⁻¹), and *P. cryptogea* (130 µg.mL⁻¹), and attributed these effects to a high concentration of citral (56%), the isomeric mixture of geranial (33%) and neral (23%), a

monoterpene with antifungal action present in EOs of *Cymbopogon citratus* (Antonioli et al. 2020; Saltos-Rezabala et al. 2022) and other lemongrasses of the genus.

Conclusion

This systematic review findings allowed for a better understanding of EOs and their application against phytopathogens, and maybe their future use as biopesticides. The *Scopus* database proved to be efficient in providing relevant studies regarding the theme, and the volume of papers analyzed in such a timeframe, and the number of publications throughout the years highlight the importance of this kind of research. Furthermore, the data generated by this work revealed the most used methods for the analysis of EOs against phytopathogens, as well as the most widely used EOs and microorganisms targeted by those studies, providing valuable insight to further research on the topic.

References

- Abdullahi A, Khairulmazmi A, Yasmeen S, et al (2020) Phytochemical profiling and antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) essential oils against important phytopathogens. *Arab J Chem* 13:8012–8025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.09.031>
- Aksit H, Bayar Y, Simsek S, Ulutas Y (2022) Chemical Composition and Antifungal Activities of the Essential Oils of Thymus Species (*Thymus pectinatus*, *Thymus convolutus*, *Thymus vulgaris*) Against Plant Pathogens. *J Essent Oil-Bearing Plants* 25:200–207. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2043189>
- Andrade-Hoyos P, Urrieta-Velázquez JA, Landero-Valenzuela N, et al (2022) Potential of essential oils in the control of *Phytophthora cinnamomi* Rands and *Fusarium* sp. in vitro in *Cinnamomum verum*. *Terra Latinoam* 40:1–10. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1004>
- Angane M, Swift S, Huang K, et al (2022) Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods* 11:. <https://doi.org/10.3390/foods11030464>
- Angelini LG, Tavarini S, Ascrizzi R, et al (2022) Composition and antifungal activity of the essential oils hydrodistilled from three accessions of pastinocello carrot (*Daucus carota* L. ssp. major). *Ind Crops Prod* 181:114797. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114797>
- Antonioli G, Fontanella G, Echeverrigaray S, et al (2020) Poly (lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control : In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chem* 326:126997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>
- Arora H, Sharma A, Sharma S (2023) Thyme essential oil fostering the efficacy of aqueous extract of licorice against fungal phytopathogens of *Capsicum annuum* L. *J Biosci Bioeng* 135:466–473. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.03.003>
- Aviv-Reuven S, Rosenfeld A (2021) Publication patterns' changes due to the COVID-19 pandemic: a longitudinal and short-term scientometric analysis. *Scientometrics* 126:6761–6784. <https://doi.org/10.1007/s11192-021-04059-x>
- Baiotto CS, Baiotto LMC, Beber SC, et al (2023) Antifungal effect of essential oils on control of phytopathogens in stored soybean seeds [Efeito antifúngico de óleos essenciais no controle de fitopatógenos em sementes de soja armazenadas]. *Rev Bras Eng Agric e Ambient* 27:272–278
- Bajpai VK, Kang S, Xu H, et al (2011) Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: A review. *Plant Pathol J* 27:207–224. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.3.207>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review \$. *J Pharm Anal* 6:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- Başaran CC, Bektaş, Küsek M (2022) Determination of Antibacterial Efficiencies of Commercial Plant Essential Oils and Tannins Against Plant Pathogenic Bacteria. *J Anim Plant Sci* 32:1323–1330. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2022.5.0539>
- Benali T, Bouyahya A, Habbadi K, et al (2020) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladaniferus* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. *Biocatal Agric Biotechnol* 28:101696. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101696>
- Bisht D, Saroj A, Durgapal A, et al (2021) Inhibitory effect of cinnamon (*Cinnamomum tamala* (Buch.-Ham.) t.nees & eberm.) essential oil and its aldehyde constituents on growth and spore germination of phytopathogenic fungi. *Trends Phytochem Res* 5:62–70. <https://doi.org/10.30495/tpr.2021.1914085.1184>
- Burt S (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Camele I, Grul'ová D, Elshafie HS (2021) Chemical composition and antimicrobial properties of *mentha* × *piperita* cv. 'kristinka' essential oil. *Plants* 10:1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10081567>
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Stud Mycol* 73:181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Chander R, Maurya AK, Kumar K, et al (2023) In vitro antidiabetic and antimicrobial activity of *Dracocephalum heterophyllum* Benth. essential oil from different sites of North-western Himalayas India. *Nat Prod Res* 37:1002–1005. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2096603>
- Chaturvedi T, Singh S, Nishad I, et al (2021) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of senescent leaves of guava (*Psidium guajava* L.). *Nat Prod Res* 35:1393–1397. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1648462>
- Christova PK, Dincheva IN, Slavov SB, et al (2021) Evaluation of growth response of phytopathogens *Alternaria alternata*, *Diaporthe nobilis* and *Phytophthora plurivora* to inhibitory potential of three essential oils of *Monarda didyma* genotypes. *J Plant Dis Prot* 128:1531–1545. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00536-w>
- Cibanal IL, Fernández LA, Rodriguez SA, et al (2022) Propolis extract combined with oregano essential oil applied to lima bean seeds against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Plant Pathol* 164:33–43. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02536-4>
- Córdova P, Rivera-González JP, Rojas-Martínez V, et al (2023) Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* as a Threat to Agriculture: Perspectives of a Promising Biological Control Using Bacteriophages and Microorganisms. *Horticulturae* 9:712. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060712>
- Davies CR, Wohlgemuth F, Young T, et al (2021) Evolving challenges and strategies for fungal

- control in the food supply chain. *Fungal Biol Rev* 36:15–26.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.01.003>
- Da Silva RS, de Oliveira MMG, de Melo JO, et al (2019) Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. *Pestic Biochem Physiol* 160:40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>
- Da Sila FFA, Alves CCF, de Oliveria Filho JG, et al (2019) Chemical constituents of essential oil from *murraya paniculata* leaves and its application to in vitro biological control of the fungus *sclerotinia sclerotiorum*. *Food Sci Technol* 39:413–417.
<https://doi.org/10.1590/fst.20218>
- Da Silva RS, De Oliveira MMG, Silva KP, et al (2020) Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ Sci Pollut Res* 27:4376–4389. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>
- De Clerck C, Maso SD, Parisi O, et al (2020) Screening of antifungal and antibacterial activity of 90 commercial essential oils against 10 pathogens of agronomical importance. *Foods* 9:.
<https://doi.org/10.3390/foods9101418>
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, et al (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dias ALB, Batista HRF, Sousa WC, et al (2022) *Psidium myrtoides* O. Berg fruit and leaves: physicochemical characteristics, antifungal activity and chemical composition of their essential oils in different seasons. *Nat Prod Res* 36:1043–1047.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1844689>
- Dong LM, Truc Quyen NT, Thu Thao LT, et al (2019) EFFECT OF CALCIUM-ALGINATE AND ESSENTIAL OIL ON *Colletotrichum acutatum* AND THE SHELF LIFE OF THE GRAPE. *Vietnam J Sci Technol* 57:657–664. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/57/6/13013>
- Dozein RF, Motamedi E, Tarighi S, et al (2023) Effects of encapsulated *Satureja hortensis*/calcium propionate against fire blight in pear cv. *Spadona*. *J Plant Pathol*.
<https://doi.org/10.1007/s42161-023-01385-2>
- El-Alam I, Raveau R, Fontaine J, et al (2020) Antifungal and phytotoxic activities of essential oils: In vitro assays and their potential use in crop protection. *Agronomy* 10:1–19.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10060825>
- Elshafie HS, Grul'ová D, Baranová B, et al (2019) Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil extracted from *Solidago canadensis* L. Growing wild in Slovakia. *Molecules* 24:1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24071206>
- Elshafie HS, Nuzzaci M, Logozzo G, et al (2020) Biological investigations on the role of

- hydrogel formulations containing bioactive natural agents against some common phytopathogens of *Phaseolus vulgaris* L. and seed germination. *J Biol Res* 93:114–122. <https://doi.org/10.4081/jbr.2020.9219>
- Feizi H, Tahan V, Kariman K (2023) In vitro antibacterial activity of essential oils from *Carum copticum* and *Ziziphora clinopodioides* plants against the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Biosyst* 157:487–492. <https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2165564>
- Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *742*:739–742
- Gheorghe DI, Bînzari V, Constantinescu-Aruxandei D, et al (2022) Activity of Thyme Essential Oils Against Plant Pathogenic Fungi and Its Potential Use As Seed Disinfectant. *AgroLife Sci J* 11:63–72. <https://doi.org/10.17930/agl202217>
- Giamperi L, Ada Bucchini AE, Ricci D, et al (2020) *Vepris macrophylla* (Baker) I. Verd essential oil: An antifungal agent against phytopathogenic fungi. *Int J Mol Sci* 21:. <https://doi.org/10.3390/ijms21082776>
- Gomes PRB, Cunha MJO, de Sousa DA, et al (2019) Chemical Study and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Branches of *Aniba duckei* Kostermans. *J Essent Oil-Bearing Plants* 22:1554–1561. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1700829>
- Hashem AH, Abdelaziz AM, Hassanin MMH, et al (2023) Potential Impacts of Clove Essential Oil Nanoemulsion as Bio Fungicides against *Neoscytalidium* Blight Disease of *Carum carvi* L. *Agronomy* 13:. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041114>
- Hendges C, Stangarlin JR, de Holanda Nozaki M, et al (2020) Antifungal activity against *Alternaria solani* and control of early blight in tomato by essential oil of bergamot orange. *Semin Agrar* 41:1861–1874. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5Supl1p1861>
- Hendges C, Stangarlin JR, Zamban VC, et al (2021) Antifungal activity and control of the early blight in tomato through tea tree essential oil. *Crop Prot* 148:105728. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105728>
- Hendges C, Stangarlin JR, Zamban VC, et al (2023) Antifungal activity against *Alternaria solani* and control of early blight in tomato by essential oil of citronella. *Rev Ceres* 70:101–111. <https://doi.org/10.1590/0034-737X202370020012>
- Hong Z, Talib KM, Mujtaba KG, et al (2021) Antifungal potential of cinnamon essential oils against *Phytophthora colocasiae* causing taro leaf blight. *Chem Biol Technol Agric* 8:1–9. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00238-3>
- Hoseini S, Amini J, Rafei JN, Khorshidi J (2019) Inhibitory effect of some plant essential oils against strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum nymphaeae* under in vitro and in vivo conditions. *Eur J Plant Pathol* 155:1287–1302. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01856-2>
- Hou H, Zhang X, Zhao T, Zhou L (2020) Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two

- main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ* 8:1–25. <https://doi.org/10.7717/peerj.9626>
- Kalhor MT, Zhang H, Kalhor GM, et al (2022) Fungicidal properties of ginger (*Zingiber officinale*) essential oils against *Phytophthora colocasiae*. *Sci Rep* 12:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06321-5>
- Karadağ AE, Üstündağ Okur N, Demirci B, Demirci F (2022) *Rosmarinus officinalis* L. essential oil encapsulated in new microemulsion formulations for enhanced antimicrobial activity. *J Surfactants Deterg* 25:95–103. <https://doi.org/10.1002/jsde.12549>
- Khoshbakht T, Karami A, Tahmasebi A, Maggi F (2020) The variability of thymol and carvacrol contents reveals the level of antibacterial activity of the essential oils from different accessions of *oliveria decumbens*. *Antibiotics* 9:1–10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070409>
- Kim JE, Lee JE, Huh MJ, et al (2019) Fumigant antifungal activity via reactive oxygen species of *thymus vulgaris* and *satureja hortensis* essential oils and constituents against *raffaelea quercus-mongolicae* and *rhizoctonia solani*. *Biomolecules* 9:. <https://doi.org/10.3390/biom9100561>
- Kong W, Xie Z, Huo H, et al (2023) Anti-Fusarium activity of essential oil distilled from artemisinin (*Artemisia annua* L.) extraction residues. *South African J Bot* 158:180–189. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.05.010>
- Krumova E, Nikolova M, Miteva-Staleva J, et al (2021) Bio-efficacy of the essential oil isolated from *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* against fungal pathogens of potato. *Comptes Rendus L'Academie Bulg des Sci* 74:1571–1578. <https://doi.org/10.7546/CRABS.2021.10.18>
- Linares MJ, Charriel G, Solís F, et al (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *J Clin Microbiol* 43:250–253. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.250-253.2005>
- Lukošiūtė S, Šemaitė L, Morkeliūnė A, et al (2020) The effect of lamiaceae plants essential oils on fungal plant pathogens in vitro. *Agron Res* 18:2761–2769. <https://doi.org/10.15159/AR.20.225>
- Macedo SA, Lundgren GA, dos Passos Braga S, et al (2020) Combined chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil to inhibit the fungal phytopathogen *Paramyothecium roridum* and control crater rot in melon (*Cucumis melo* L.). *Brazilian J Microbiol* 51:2057–2065. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00378-y>
- Mamoucha S, Prombona A, Galeou A (2023) Evaluation of the antibacterial activity of essential oil of *Laurus nobilis* against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and potential biocidal action. *Hell Plant Prot J* 16:29–39. <https://doi.org/10.2478/hppj-2023-0005>
- Manssouri M, Ou-Ani O, Oucheikh L, et al (2022) Antifungal activity and chemical composition of essential oil from *Santolina pectinata* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Arab J Med Aromat Plants* 8:41–54. <https://doi.org/10.48347/IMIST.PRSM/ajmap->

v8i1.26656

- Marin VR, Ferrarezi JH, Vieira G, Sass DC (2019) Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. *World J Microbiol Biotechnol* 35:. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2646-5>
- Martins SHF, Ferreira-Silva A, Cruz RS, et al (2022) Antifungal Film Incorporated with *Chenopodium ambrosioides* L. Essential Oil for Postharvest Storage. *ACS Food Sci Technol* 2:1086–1095. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00039>
- Medjahed IM, Benyelles NG, Senouci H, Gaouar MY (2023) Individual and Combined Antifungal Activities of *Artemisia herba alba* and *Ammoides verticillata* Essential Oils against the Three Main Pathogenic Microorganisms of Potato. *Comb Chem High Throughput Screen* 26:1920–1928. <https://doi.org/10.2174/1386207326666230315141647>
- Menezes Filho CA, Castro CF de S (2019) Chemical characterization and antifungal activity of orange Kinkan (*Fortunella margarita*). *Folia Amazónica* 28:185–198
- Merad N, Andreu V, Chaib S, et al (2021) Essential oils from two apiaceae species as potential agents in organic crops protection. *Antibiotics* 10:1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060636>
- Mongkol R, Nilprapruck P, Yoshida AK (2020) Antifungal and antibacterial activities of essential oil from Som Keaw (*Citrus nobilis*) in Thailand. *Int J Agric Technol* 16:887–896
- Morkeliūnė A, Rasiukevičiūtė N, Valiuškaitė A (2021) Pathogenicity of *colletotrichum acutatum* to different strawberry cultivars and anthracnose control with essential oils. *Zemdirbyste* 108:173–180. <https://doi.org/10.13080/z-a.2021.108.023>
- Naserzadeh Y, Mahmoudi N, Pakina E (2019) Antipathogenic effects of emulsion and nanoemulsion of cinnamon essential oil against *Rhizopus* rot and grey mold on strawberry fruits. *Foods Raw Mater* 7:210–216. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-210-216>
- Nie Y, Pan Y, Jiang Y, et al (2023) Stability and bioactivity evaluation of black pepper essential oil nanoemulsion. *Heliyon* 9:e14730. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14730>
- Nouri M, Baghaee-Ravari S, Emadzadeh B (2021) Nano-emulsified savory and thyme formulation show limited efficacy to suppress *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* compared with pure oil. *Ind Crops Prod* 161:113216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113216>
- Oliveira J, Parisi MCM, Baggio JS, et al (2019) Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. *Int J Food Microbiol* 292:150–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014>
- Ollinaho OI, Pedlowski MA, Kröger M (2023) Toxic turn in Brazilian agriculture? The political economy of pesticide legalisation in post-2016 Brazil. *Third World Q* 44:612–630. <https://doi.org/10.1080/01436597.2022.2153031>
- Ou-Ani O, Moujane S, Oucheikh L, et al (2023) Chemical Composition, in vitro Antifungal

- Activity, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Studies of the Essential Oil of *Ballota hirsuta*. *J Biol Act Prod from Nat* 13:27–48.
<https://doi.org/10.1080/22311866.2023.2194862>
- Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A (2016) Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 5:1–10. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
- Pandey AK, Kumar P, Singh P, et al (2017) Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front Microbiol* 7:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Patel HK, Gomes EN, Wu Q, et al (2023) Volatile metabolites from new cultivars of catnip and oregano as potential antibacterial and insect repellent agents. *Front Plant Sci* 14:1–14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1124305>
- Pedrotti C, Franzoi C, Rosa MTS, et al (2022) Antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus staigeriana* against *Alternaria alternata* causing of leaf spot and black rot in table grapes. *An Acad Bras Cienc* 94:e20200394. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220200394>
- Peixoto PMC, Júlio AA, Jesus EG de, et al (2023) Fungicide potential of citronella and tea tree essential oils against tomato cultivation's phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and analysis of their chemical composition by GC/MS. *Nat Prod Res* 0:1–6.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2184358>
- Pepa T Della, Elshafie HS, Capasso R, et al (2019) Antimicrobial and phytotoxic activity of *origanum heracleoticum* and *O. Majorana* essential oils growing in cileto (Southern Italy). *Molecules* 24:1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24142576>
- Połeć K, Barnaś B, Kowalska M, et al (2019) The influence of the essential oil extracted from hops on monolayers and bilayers imitating plant pathogen bacteria membranes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 173:672–680. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.047>
- Proto MR, Biondi E, Baldo D, et al (2022) Essential Oils and Hydrolates: Potential Tools for Defense against Bacterial Plant Pathogens. *Microorganisms* 10:.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10040702>
- Ramadas K, Suresh G, Janarthanan N, Masilamani S (1998) Antifungal activity of 1,3-disubstituted symmetrical and unsymmetrical thioureas. *Pestic Sci* 52:145–151.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199802\)52:2<145::AID-PS677>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199802)52:2<145::AID-PS677>3.0.CO;2-J)
- Raveau R, Fontaine J, Soltani A, et al (2022) In Vitro Potential of Clary Sage and Coriander Essential Oils as Crop Protection and Post-Harvest Decay Control Products. *Foods* 11:1–24.
<https://doi.org/10.3390/foods11030312>
- Raynaud M, Goutaudier V, Louis K, et al (2021) Impact of the COVID-19 pandemic on publication dynamics and non-COVID-19 research production. *BMC Med Res Methodol* 21:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12874-021-01404-9>
- Reyna LEA, Gastelum YGU, Díaz BHC, et al (2022) Antifungal Activity of a Chitosan and Mint Essential Oil Coating on the Development of *Colletotrichum Gloeosporioides* in Papaya

- Using Macroscopic and Microscopic Analysis. *Food Bioprocess Technol* 15:368–378. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02764-w>
- Ríos JL (2015) Essential Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc., pp 3–10
- Rodrigues TC, Gois IB, Fernandes RPM, et al (2023) Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Pestic Biochem Physiol* 193:. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105454>
- Rozwalka LC, Moreira RR, Ballesteros Garcia MJ, et al (2020) Chemical components of essential oils as a base to control two grape pathogens: *Sphaceloma ampelinum* and *Pseudocercopora vitis*. *J Phytopathol* 168:342–352. <https://doi.org/10.1111/jph.12898>
- Salto-Rezabala LA, Silveira PR Da, Tavares DG, et al (2022) Thyme Essential Oil Reduces Disease Severity and Induces Resistance against *Alternaria linariae* in Tomato Plants. *Horticulturae* 8:. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100919>
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, et al (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* 3:430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, et al (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol* 29:690–695. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.08.001>
- Šernaitė L, Rasiukevičiūtė N, Dambrauskienė E, et al (2020) Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. *Zemdirbyste* 107:147–152. <https://doi.org/10.13080/z-a.2020.107.019>
- Saroj A, Chanotiya CS, Maurya R, et al (2019) Antifungal action of *Lippia alba* essential oil in *Rhizoctonia solani* disease management. *SN Appl Sci* 1:1–12. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1207-8>
- Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, et al (2017) Biological activities of essential oils: From plant chemocology to traditional healing systems
- Sotelo JP, Oddino C, Giordano DF, et al (2021) Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on soybeans seeds infected with *Pseudomonas syringae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 116:101735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101735>
- Soliman SA, Hafez E, Alkolaibe AMG, et al (2022) Biochemical Characterization, Antifungal Activity, and Relative Gene Expression of Two *Mentha* Essential Oils Controlling *Fusarium oxysporum*, the Causal Agent of *Lycopersicon esculentum* Root Rot. *Plants* 11:. <https://doi.org/10.3390/plants11020189>
- Sridhar SR, Rajagopal RV, Rajavel R, et al (2003) Antifungal Activity of Some Essential Oils. *J Agric Food Chem* 51:7596–7599. <https://doi.org/10.1021/jf0344082>
- Summerell BA (2019) Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol*

- 57:323–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
- Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan X, et al (2016) Bacterial disease management: Challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in bacterial molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 17:1506–1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Tabanca N, Demirci B, Wedge DE, et al (2019) Rapid evaluation of salvia pachystachya essential oil against three colletotrichum species causing anthracnose on strawberries. *Nat Volatiles Essent Oils* 6:1–8
- Tarakanov RI, Dzhililov FSU (2022) Using of Essential Oils and Plant Extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on Soybean. *Plants* 11:. <https://doi.org/10.3390/plants11212989>
- Tico BM, Silva HF, Silva EC, et al (2019) Óleos essenciais no controle do *Fusarium* sp. da cana de açúcar in vitro. *Rev Bras Meio Ambient* 7:070–079
- Tomazoni EZ, Ribeiro RTS, Pauletti GF, et al (2019) Inhibition of *Alternaria* stem canker on tomato by essential oils from *Baccharis* species. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 54:781–790. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1633212>
- Valadares ACF, Fernandes CC, de Oliveira Filho JG, et al (2020) Incorporation of essential oils from piper aduncum into films made from arrowroot starch: Effects on their physicochemical properties and antifungal activity. *Quim Nova* 43:729–737. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170530>
- Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil Á (2019) Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. *Nutrients* 11:2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>
- Verdeguer M, Roselló J, Castell V, et al (2020) Cherry tomato and persimmon kaki conservation with a natural and biodegradable film. *Curr Res Food Sci* 2:33–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.11.005>
- Villada-Ramos J, Aguillón-Osma J, Soto-Rueda E, Loango-Chamorro N (2021) Evaluation of antibacterial activity of extract and essential oil of *Tagetes patula* L. in vitro against *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Arch Phytopathol Plant Prot* 54:1484–1500. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1916185>
- Walia S, Saha S, Tripathi V, Sharma KK (2017) Phytochemical biopesticides: some recent developments. *Phytochem Rev* 16:989–1007. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9512-6>
- Wang B, Liu F, Li Q, et al (2019) Antifungal activity of zedoary turmeric oil against *Phytophthora capsici* through damaging cell membrane. *Pestic Biochem Physiol* 159:59–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.014>
- Weisany W, Samadi S, Amini J, et al (2019) Enhancement of the antifungal activity of thyme and dill essential oils against *Colletotrichum nymphaeae* by nano-encapsulation with copper NPs. *Ind Crops Prod* 132:213–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.031>

- Weisany W, Samadi S, Tahir NA et al (2022) Nano-encapsulated with mesoporous silica enhanced the antifungal activity of essential oil against *Botrytis cinerea* (Helotiales; Sclerotiniaceae) and *Colletotrichum nymphaeae* (Glomerellales; Glomerellaceae). *Physiol Mol Plant Pathol* 122:101902. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101902>
- White LAS, Blank AF, Gagliardi PR, et al (2019) In vitro antifungal activity of *Myrcia ovata* essential oils and their major compounds against pathogens of citrus, sweet potato, and coconut. *Biosci J* 35:1695–1707. <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n6a2019-42425>
- Wilson, C. R. Plant pathogens-the great thieves of vegetable value. *Acta Horticulturae*, [s. l.], v. 1123, p. 7–15, 2016.
- Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW (2013) *Alternaria* redefined. *Stud Mycol* 75:171–212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- Yfanti P, Patakioutas G, Douma D, Lekka ME (2021) In Vitro Antifungal Activity of *Satureja horvatii* ssp. *macrophylla* Against 3 Tomato Phytopathogenic Fungi. *Nat Prod Commun* 16:. <https://doi.org/10.1177/1934578X211025165>
- Yilmaz MT, Yilmaz A, Akman PK, et al (2019) Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. *Innov Food Sci Emerg Technol* 52:166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.005>
- Zamuner CFC, Marin VR, Dilarri G, et al (2023) Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker. *Front Agron* 5:1–11. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1148969>
- Zatla AT, Mami I, Dib MEA, Sifi MEA (2020) Efficacy of Essential Oil and Hydrosol Extract of *Marrubium vulgare* on Fungi Responsible for Apples Rot. *Anti-Infective Agents* 18:285–293. <https://doi.org/10.2174/2211352517666190618105332>
- Zefzoufi M, Smaili A, Fdil R, et al (2020) Composition of essential oil of Moroccan *Dysphania ambrosioides* and its antimicrobial activity against bacterial and fungal phytopathogens. *J Plant Pathol* 102:47–58. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00371-x>
- Zhang H, Kalhor MT, Huo D, et al (2023) Screening antifungal properties of essential oils against taro leaf blight disease. *J Plant Dis Prot* 130:599–608. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00706-y>
- Zhou L, Li J, Kong Q, et al (2021) Chemical composition, antioxidant, antimicrobial, and phytotoxic potential of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* leaves essential oils. *Molecules* 26:. <https://doi.org/10.3390/molecules26051450>
- Znini M (2021) Chemical Composition, Liquid and Vapor-phase Antifungal Activities of Essential Oil of *Teucrium luteum* subsp. *flavovirens* against Three Postharvest Phytopathogenic Fungi. *Int J Fruit Sci* 21:400–412. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.1895033>
- Da Silva RS, De Oliveira MMG, Silva KP, et al (2020) Synergistic effect of *Cordia curassavica*

Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ Sci Pollut Res* 27:4376–4389. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>

Capítulo 2

**Doutorado Acadêmico para Inovação: Óleos essenciais como alternativas para
sanitização de limas ácidas “Tahiti”**

Aluno: M. Sc. Vítor Rodrigues Marin

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daiane Cristina Sass

Resumo

Um sistema agroecônômico sustentável é aquele que permite o aumento no volume e na melhora da qualidade dos alimentos produzidos sem que o meio ambiente e a saúde humana sejam comprometidos. Parte fundamental deste sistema passa pelo desenvolvimento de novos agroquímicos, capazes de mitigar perdas geradas por fitopatógenos e com menor potencial tóxico, quando comparados as alternativas convencionais. Nesse contexto, o presente projeto analisou a capacidade de formulações com óleos essenciais (OEs) como princípios bioativos, como agentes sanitizantes contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. (*X. citri*) na pós-colheita de limas ácidas ‘Tahiti’. A *X. citri*, causadora do cancro cítrico, é considerada uma praga quarentenária que afeta todas as variedades de citrus comerciais e é capaz de reduzir a qualidade e rendimento dos frutos obtidos. Dos 16 OEs triados inicialmente, os óleos de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) foram capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano *in vitro* na menor concentração testada (0,03%, v/v). Os óleos foram formulados separadamente, e enquanto formulações, foram capazes de reduzir em até $4 \log^{10}$ CFU.mL⁻¹ de células bacterianas da superfície dos frutos. Ademais, os produtos também foram avaliados quanto a alterações físicas nas cascas dos frutos. Os resultados revelaram que os produtos formulados mantêm a cor verde das cascas dos frutos e não afetam o diâmetro e peso dos frutos durante o decorrer do experimento. Foi possível concluir que o uso das formulações contendo o OEs de capim-limão e de orégano foram capazes de remover as células de *X. citri* dos frutos sem que suas características visuais, peso e diâmetro fossem alterados, apontando para um possível uso comercial destes produtos.

Palavras-chave: sanitização, *xanthomonas*, citros, óleos essenciais

Abstract

A sustainable agroeconomic system secures the increases in volume and quality of food produced without hindering the environment and human health. A fundamental part of this system goes through the development of new agrochemicals capable of controlling phytopathogens with lower toxic potential, if compared with conventional products. In this context, the featured project analyzed formulations with essential oils (OEs) as active ingredients as sanitizers against the bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) in the post-harvest of acid limes 'Tahiti'. *X. citri* is the known causer of the citrus canker, a quarentenary disease that affects all citrus commercial varieties and can reduce the quality and quantity of fruit obtained. Initially, 16 OEs were tested, and the oils from oregano (*Origanum vulgare*) and lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) inhibited the growth of the bacteria in the lowest concentration tested (0,03%, v/v). The oils were formulated separately, and the formulations reduced the bacterial cells in the surface of the fruit in $4 \log^{10}$ CFU.mL⁻¹. Furthermore, the products were evaluated as to their physical effects on the fruit peel. Results revealed that the formulations maintained the natural green color of the fruit and did not affect the diameter or weight of the fruit. Finally, it is possible to conclude that the formulations containing OEs were able to successfully remove *X. citri* cells from fruit without altering their visual, weight and diameter, pointing for a future commercial use of these products.

Keywords: sanitization, *Xanthomonas*, citrus, essential oils

1. Introdução

Dentre as produções de frutas cítricas, a de limas ácidas ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tanaka), conhecida popularmente como limão ‘Tahiti’ ou limão-verde, é uma das produções permanentes de destaque no Brasil, com cerca de 1.5 milhões de toneladas sendo produzidas em território nacional anualmente, o que coloca o país em quinto lugar na produção mundial (IBGE 2021; FAO 2021). Segundo a Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo, em 2023, cerca de 8% da produção interna brasileira é destinada à exportação, com quase todo montante sendo direcionado a União Europeia, fazendo com que 67% das limas ácidas consumidas nesses países sejam de origem brasileira (São Paulo, DAESP, 2023).

A fruta da limeira ácida ‘Tahiti’ é descrita como de casca lisa, de cor verde intensa, tamanho médio, sem sementes e que pode ser obtida durante todo o ano. Grande parte do consumo se dá ou pela fruta fresca ou pela fabricação de sucos. Além da versatilidade, podendo ser utilizada na culinária e coquetelaria, sua composição a associa com benefícios a saúde, como a presença de vitamina C (aprox. 20mg a cada 100g), açúcares (frutose, sacarose, glicose), minerais (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) e fibras (Donkersley *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2012; Rangel *et al.*, 2011). Além de seu consumo, limões ‘Tahiti’ são fontes de óleos essenciais e moléculas como o limoneno, amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas e perfumaria devido seu potencial aromatizante e flavorizante (Lota *et al.*, 2002).

Ainda assim, mesmo com montantes expressivos, a produção de limas ácidas pode ser afetada por uma variedade de fitopatologias associadas a microrganismos. Aqui destaca-se a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), conhecida como agente causal do cancro cítrico. A doença é responsável por perdas consistentes em todas as variedades de frutas cítricas comerciáveis, levando a perdas tanto na quantidade, quanto na qualidade dos frutos, que são

acometidos por lesões (FERENCE *et al.*, 2018; NAQVI *et al.*, 2022). Essas lesões são os sintomas iniciais da infecção, surgindo tanto em folhas quanto frutos, têm formato de pústulas elevadas de coloração marrom, com amarelamento em áreas adjacentes, e podem levar a defoliação e queda de frutos em casos mais severos (BEHLAU, 2021; NAQVI *et al.*, 2022; SCHUBERT *et al.*, 2001).

Devido seu potencial nocivo a bactéria *X. citri* foi classificada como praga quarentenária. Essa classificação cria uma série de barreiras sanitárias que restringem a comercialização de frutos vindos de áreas com incidência, especialmente para regiões ainda livres da doença, bem como preveem a aplicação de estratégias integradas para seu controle (Behlau, 2021). Dentre as técnicas empregadas podemos citar o emprego de mudas sadias, cultivares naturalmente resistentes, quebra-ventos entre pomares, controle de insetos como a larva-minadora (*Phyllocnistis citrella*), que pode facilitar as infecções devido a lesões causadas na superfície foliar, e a aplicação de formulações a base de compostos cúpricos (Behlau, 2021; FERENCE *et al.*, 2018; Gottwald *et al.*, 2007). A última, que se destaca como a alternativa com maior eficiência no controle da doença, levanta sérios questionamentos sob seus efeitos a longo prazo, tanto para o ambiente quanto para saúde humana, por se tratar de um metal pesado com características cumulativas no solo e corpos de água; como também, pelo surgimento de linhagens resistentes e tolerantes a cobre do gênero *Xanthomonas*, indicando o surgimento de mecanismos de resistência bacteriana (Behlau *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2020; FERENCE *et al.*, 2018).

Além do surgimento de linhagens resistentes, o uso intensivo de agroquímicos, como os baseados em cobre, é um limitante para a aplicação e desenvolvimento de abordagens sustentáveis, como cultivos agroecológicos e/ou agricultura orgânica. Tais alternativas tem ganhado destaque mundialmente, sendo impulsionados tanto pela opinião pública quanto por legislações e acordos

comerciais, sendo tópico de discussões em encontros internacionais como as convenções de Rotterdam e Estocolmo (Jacquet *et al.*, 2022; Sapbamrer *et al.*, 2023).

Blocos econômicos como a União Europeia, tem feito avanços consideráveis, como por exemplo a proposição de um novo *Green Deal* para os países membros, que pretende, dentre outros objetivos, elevar a produção de orgânicos no bloco para 25% da produção total até 2030, o que acarretaria a uma drástica queda no volume de agroquímicos utilizados nas lavouras europeias (Robu *et al.*, 2023). Além disso, é esperado que o número de importações dos países-membro também aumente até o final do período, e que os produtos adquiridos sigam os mesmos, ou similares, regramentos que os produzidos em solo europeu (Robu *et al.*, 2023).

Como parte do processo de beneficiamento de frutos na pós-colheita, as limas devem suas cascas desinfectadas da bactéria *X. citri*, impedindo sua disseminação pelo transporte de frutos e viabilizando sua exportação. Visto que grande parte de limas ácidas ‘Tahiti’ produzidas no Brasil tem como destino países europeus, e que tais nações tem feito esforços consideráveis para uso de produtos orgânicos, surge a necessidade do desenvolvimento de técnicas e produtos que atendam os requerimentos de exportação, servindo de alternativas para os produtores. No ramo de produtos orgânicos, existem uma pequena variedade de produtos aprovados para sanitização, sendo um deles o componente ativo da formulação utilizada pela empresa *Andrade Sun Farms*, parceira do projeto, porém, esta substância, após seguidos adiamentos, terá sua aprovação expirada no final de 2023 (*EU Pesticides database*).

Devido tais complicações, se faz necessário o desenvolvimento de um novo produto capaz de remover as células de *X. citri* da superfície dos frutos, ao mesmo tempo que preserve suas qualidades organolépticas e atenda aos requerimentos impostos pelos países importadores. Neste contexto, o uso de óleos essenciais (OEs) pode ser uma alternativa para o controle da *X. citri*. OEs

são descritos como líquidos oleosos, hidrofóbicos, aromáticos e voláteis, que podem ser obtidos de praticamente toda a planta (flores, raízes, folhas, frutos e demais partes) (Falleh *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2017).

Essas substâncias são consideradas, em geral, como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo órgão de regulação americano (*Food and Drug Administration* – FDA), por não apresentarem efeitos de tolerância quando usados como aditivos alimentares. Em geral, os componentes ativos de OEs mostram baixa toxicidade para mamíferos e uma persistência reduzida no ambiente devido à sua volatilidade (Isman *et al.*, 2011). Estas características, associadas ao amplo espectro de atividades, como anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica e antibacteriana, colocam os óleos essenciais como candidatos viáveis a serem explorados no desenvolvimento de soluções contra fitopatógenos, seja pela sua aplicação direta ou pela formulação com sua diversa variedade de moléculas (Isman & Machial, 2006; Capítulo 1).

Estudos como de Pepa *et al.* (2022) mostram a ação antibacteriana do OE de *Origanum compactum*, uma espécie de orégano, que foi capaz de inibir completamente o crescimento de bactérias gram-negativas como *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas savastanoi*, *Allorhizobium vittis* e *Erwinia amylovora* em concentrações como 0.03% (v/v). Microrganismos gram-positivos, como a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* também são alvos de estudo, como por exemplo em estudo por Tarakanov & Dzhalivov (2022), que apontaram a ação antibacteriana dos óleos de gênero *Allium* contra o fitopatógeno. Neste contexto, já existem a utilização de OEs ou de produtos compostos em parte por eles, como por exemplo o óleo de neem (*Azadirachta indica*), ou mesmo o cinamaldeído, componente principal dos óleos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), já são alternativas comerciais em uso por produtos (Qu *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2017).

Por fim, a parceria proposta no edital DAI visou o desenvolvimento de uma formulação, contendo OEs como princípios ativos, com a capacidade de eliminar as células bacterianas de *X. citri* das cascas de limas ácidas ‘Tahiti’ durante o processo de beneficiamento dos frutos, sem que sofressem alterações na qualidade e propriedades organolépticas dos frutos durante o processo de armazenagem e transporte.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais e suas formulações frente a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, investigando sua ação bactericida, seus alvos na célula bacteriana, sua capacidade de inibir a formação de lesões em mudas de plantas cítricas e sua ação sanitizante para remoção de células bacterianas da superfície de limas ácidas orgânicas.

2.2. Objetivos específicos

- Definir as concentrações bactericidas para os óleos essenciais (*in vitro*) contra a bactéria *X. citri* subsp. *citri*.
- Avaliar os efeitos dos óleos essenciais na formação de biofilme e na membrana celular bacteriana, a fim de identificar os possíveis alvos celulares para sua ação antibacteriana.
- Determinar a composição dos óleos essenciais utilizados, identificando seus principais princípios ativos.
- Avaliar a atividade fitotóxica dos óleos essenciais em sementes modelo.
- Avaliar a capacidade dos óleos essenciais em reduzir a formação de lesões de cancro cítrico em mudas de *Citrus sinensis*.
- Estabelecer uma formulação dos óleos essenciais considerados ativos contra a bactéria alvo, e sua capacidade de remoção de células das cascas de limas ácidas “Tahiti”.
- Avaliar as características físicas das limas ácidas “Tahiti” após a aplicação dos tratamentos.

3. Material e Métodos

3.1. Microrganismos

A bactéria fitopatogênica *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1594 – wt306) (*X. citri*) foi cedida pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira, do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro. A linhagem bacteriana está conservada a -80°C.

3.2. Óleos Essenciais

Os OEs utilizados no projeto foram selecionados de acordo com sua atividade antibacteriana já descrita na literatura (Tabela 1). Os OEs foram adquiridos da *Oshadhi*® (Colombo, Paraná, Brasil) que dispõe de certificação de produtos orgânicos, garantindo que os óleos utilizados não continham aditivos como solventes e diluentes, bem como assegurando a ausência de agroquímicos, sendo provenientes de culturas orgânicas. A composição dos OEs foi disponibilizada pela empresa e aqueles selecionados em etapas posteriores do projeto tiveram sua composição confirmada por análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, utilizando clorofórmio (CHCL₃) como solvente em um equipamento Bruker (Massachusetts, EUA) modelo DRX-400 (400 MHz., NMR ¹H).

Tabela 1. Óleos essenciais selecionados mediante efeito antimicrobiano descrito na literatura.

Espécie	Nome popular	Referência
<i>Citrus Limonum</i>	Limão siciliano	(Oliveira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Citrus Sinensis</i>	Laranja doce	(Geraci <i>et al.</i> , 2017)
<i>Cymbopogon Flexuosus</i>	Capim-limão	(Da Silva Gündel <i>et al.</i> , 2018)
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa	(Prashar <i>et al.</i> , 2003)
<i>Cymbopogon Nardus</i>	Citronela	(Guandalini Cunha <i>et al.</i> , 2020)
<i>Coriandrum Sativum</i>	Coentro	(Kačániová <i>et al.</i> , 2020)
<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto-limão	(Miguel <i>et al.</i> , 2018)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	(De Rapper <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lavandula stoechas</i>	Rosmaninho	(Insawang <i>et al.</i> , 2019)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca	(Battisti <i>et al.</i> , 2021)
<i>Menta x piperita</i>	Hortelã	(Benzaid <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjerição	(Stanojevic <i>et al.</i> , 2017)
<i>Origanum Vulgare</i>	Orégano	(Busatta <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pelargonium roseum</i>	Gerânio	(Azhdarzadeh <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	(Bozin <i>et al.</i> , 2007)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo	(Radünz <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Elaborado pelo Autor

3.3. Avaliação de atividade antibacteriana contra *X. citri*

Para avaliar a ação antibacteriana dos OEs, um teste de contagem de colônias foi realizado, como descrito em Zamunér *et al.*, (2020). Células de *X. citri* foram suspensas em meio de cultivo *Nutriente Yeast Glycerol* (NYG: 5 g.L⁻¹ de peptona; 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 2 % (v/v) de glicerol; 15 g.L⁻¹ de ágar para meio sólido) e cultivadas até atingirem densidade óptica (D.O.) de

0.4 (a 600 nm). Alíquotas do meio foram diluídas em micro tubos graduados contendo meio de cultivo NYG e os tratamentos a serem avaliados de maneira que cada micro tubo contivesse 10^6 células em um volume final de 1,5 mL.

Previamente a adição do inóculo bacteriano, os OEs foram diluídos a partir de uma solução estoque (10%, v/v, em água) para as concentrações de: 0.5; 0.25; 0.125; 0.06 e 0.03% (v/v) em meio NYG. As soluções-estoque de cada óleo foram agitadas vigorosamente com auxílio de um agitador de bancada (tipo *vortex*) por 5 min, previamente as transferências. Como controle positivo (CP) foi utilizado o antibiótico Canamicina em uma concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o controle negativo (CN) consistiu apenas de meio de cultivo e inóculo bacteriano. Os tubos foram mantidos em a 29°C e 200 rpm por 4 h.

Após o período de incubação, alíquotas de 100 μL de cada um dos tratamentos foram coletadas e diluídas em série (10^1 - 10^6) em micro tubos contendo solução salina (NaCl 0.85% v/v). Um total de seis alíquotas de 10 μL de cada uma das diluições foram então inoculadas em placas contendo meio de cultivo NYG sólido (Figura 1). As placas foram então incubadas a 29°C por aproximadamente 72 h, quando foi possível então fazer a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada diluição (Figura 1). Após a contagem foi possível definir a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é menor concentração a qual não apresenta crescimento bacteriano, bem como os números de UFC.mL^{-1} ($\text{UFC.mL}^{-1} (\log 10)$). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três eventos distintos.

Figura 1. Exemplo de placa utilizada na avaliação da atividade bacteriana após o período de incubação.



Foto: Elaborado pelo autor

3.3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs enquanto princípios ativos da formulação

Com o objetivo de substituir o princípio ativo de um produto já existente, em uso pela empresa parceira, os OEs selecionados na etapa anterior, passaram por uma nova etapa de avaliação de sua capacidade antibacteriana enquanto formulados. Para isso, a formulação utilizada no produto original foi mantida, porém, o princípio ativo foi substituído por um dos OEs. A formulação consiste em água, o princípio ativo em concentrações variadas (0.03% ~ 2%, v/v) e um agente emulsificante em concentração fixa (2% v/v). O método para testagem utilizado foi o mesmo descrito previamente, e como referência, a formulação original (FO) utilizada pela empresa foi avaliada nas mesmas condições e um controle de veículo (CV), composto pelo produto sem adição de princípio ativo, foi utilizado.

3.4. Ensaios de toxicidade em sementes

Com objetivo de caracterizar a ação e dos OEs selecionados, um ensaio de germinação de sementes foi elaborado para avaliar sua atividade fitotóxica, para tal, serão utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) (ISLA[®] lote: 139434-002) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (ISLA[®] lote: 139416-00). O ensaio segue as recomendações apresentadas nas Regras Para Análise de Sementes, de 2009, publicadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2009), com adaptações.

Para cada espécie de planta, foram posicionadas 15 sementes em placas de petri contendo duas camadas de papel filtro qualitativo (Figura 2), ambos previamente esterilizados, em quatro placas, totalizando 60 sementes por tratamento. As formulações utilizadas foram avaliadas com concentrações variadas dos OEs: 0.5; 0.25; 0.125; 0.06 e 0.03% (v/v). Como controle positivo foi utilizada uma solução de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) a 0,01 M, e como controle negativo foi utilizada apenas água destilada. Para cada tratamento foram adicionados 2 mL de cada solução, de modo que o papel filtro ficasse úmido sem que ocorresse o acúmulo de líquido na placa. Para garantir que qualquer efeito observado fosse relacionado a presença dos OEs avaliados, um controle de veículo foi adicionado ao teste, constituído apenas da formulação base, sem os princípios ativos (OEs). As placas foram então fechadas com plástico filme e levada a incubadora a 25°C com 12 h de fotoperíodo, por cinco (alface) e sete (tomate) dias.

Figura 2. Exemplos de placas contendo sementes de tomate antes e após sete dias de incubação



Fonte: Elaborado pelo autor

Após o período de incubação, o número de sementes germinadas foi contado e o tamanho de suas radículas foi mensurado (mm). O teste foi considerado válido quando 90% das sementes do controle negativo germinaram e 90% das sementes do controle positivo não germinaram, como proposto em Pecora *et al.* (2018). Esses dados permitiram o cálculo de sementes germinadas (G%), índice de elongação radicular relativa (ER%) e índice de germinação (G1%), de acordo com as equações abaixo:

Sementes Germinadas (G%)

$$= \frac{\text{número de sementes germinadas no tratamento}}{\text{número de sementes germinadas no controle negativo}} \times 100$$

Elongação Radicular Relativa (ER%)

$$= \frac{\text{média do comprimento radicular no tratamento}}{\text{média do comprimento radicular no controle negativo}} \times 100$$

Índice de Germinação (GI%)

$$= \frac{\text{Sementes Germinadas (G\%)} \times \text{Elongação Radicular Relativa (ER\%)}}{100}$$

Os resultados obtidos pela fórmula do Índice de Germinação (GI%) permitem avaliar os efeitos tóxicos dos compostos nas sementes de acordo com: valores obtidos acima de 120 revelam que os compostos avaliados têm capacidade de promover a germinação e crescimento das sementes; valores entre 120 e 80 indicam que os compostos avaliados pouco ou nada interferem na germinação e crescimento das plântulas; valores abaixo de 80 indicam efeitos tóxicos relacionados a presença dos compostos avaliados.

3.5. Inibição da formação de biofilme

Na tentativa de identificar possíveis alvos dos OEs selecionados na célula e metabolismo bacteriano, foi realizado um ensaio para avaliar a capacidade dos OEs em inibir ou reduzir a formação de biofilme bacteriano. Os OEs selecionados foram submetidos a um teste colorimétrico com cristal violeta como descrito por Malamud *et al.* (2011), com adaptações. Os OEs selecionados foram testados nas concentrações de 0.25% ~ 0.007% (v/v), de maneira que o intervalo de concentrações avaliadas compreendesse a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e concentrações inferiores, onde crescimento bacteriano é pouco ou não afetado. Os OEs foram diluídos em meio XVM2 (Wengelnik *et al.*, 1996) (1.1688 g.L⁻¹ NaCl₂; 1.3213 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 1.2324 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0.11099 g.L⁻¹ CaCl₂; 0.217744 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 0.55737 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0.0028 g.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 3.423 g.L⁻¹ Sacarose; 1.8016 g.L⁻¹ Frutose; 0.3 g.L⁻¹ Casaminoácidos.

O ensaio foi montado em uma placa de 96 poços. Os poços das colunas e linhas mais externas foram preenchidos com solução salina (NaCl, 0.85% v/v) e não utilizados durante o

ensaio. Os OEs diluídos em meio XVM2 foram adicionados a placa e diluídos subsequentemente, de maneira que cada poço atingisse um volume total de 200 μL . O inóculo bacteriano foi preparado como descrito no item 3.3. e padronizado para uma D.O. de 0.4 (a 600 nm), quando então 5 μL de inóculo foram adicionados a cada poço da placa. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultivo e inóculo bacteriano. A placa foi vedada com plástico filme e acondicionada em um recipiente forrado com papéis toalha umedecidos com água destilada, para manutenção da umidade. O recipiente foi selado e mantido à 29°C por 72h.

Após o período de incubação, foi realizada a mensuração da Densidade Óptica (a 600 nm) através de um leitor de microplacas (*Biotek Synergy H1 microplate reader*). O conteúdo de cada poço foi removido e descartado, sendo então cada poço cuidadosamente lavado com 300 μL de água destilada duas vezes, para que fossem removidas as células não aderidas a superfície do poço. A placa foi então deixada em estufa à 37°C até que estivesse completamente seca. Foram adicionados 300 μL de uma solução de 0.1% (v/v) de Cristal Violeta a cada poço e placa foi acondicionada por 15 min em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi então removido e a placa novamente lavada e secada, como descrito anteriormente. Para suspender o cristal violeta aderido ao biofilme bacteriano foram utilizados 270 μL de uma solução de 30% (v/v) de ácido acético (CH_3COOH), quando então foi realizada uma mensuração da absorbância (a 590 nm) em um leitor de microplacas.

O ensaio foi realizado em triplicata em três eventos distintos. Para avaliar a formação de biofilme mediante a presença dos OEs, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Formação de Biofilme} = \frac{\text{Absorbância do Cristal Violeta}_{(a\ 590\ \text{nm})}}{\text{Densidade Óptica após incubação}_{(a\ 600\ \text{nm})}}$$

As diferenças na formação de biofilmes entre os tratamentos foram analisadas estatisticamente através de uma análise não paramétrica de variância de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn ($p < 0,05$).

3.6 Capacidade de permeabilização da membrana celular bacteriana

Ainda, na tentativa de analisar os possíveis alvos bacteriano dos OEs, foi feito um ensaio de integridade de membrana celular, para avaliar sua ação em células de *X. citri*, como descrito por Caccalano *et al.* (2021). O inóculo bacteriano foi preparado como descrito anteriormente (item 3.3), e padronizado para uma D.O. de 0.4 (a 600 nm). Os tratamentos consistiram nos OEs de orégano e capim limão, avaliados em sua Concentração Bactericida Mínima (MBC) (0.03%, v/v), 100 μ L de inóculo bacteriano e meio de cultivo NYG para um volume total de 1 mL, o conteúdo foi acondicionado em micro tubos por 15 e 30 min. a 29°C. O controle positivo (CP) consistiu em um tratamento térmico (Savietto *et al.*, 2018), onde as células são submetidas a stress térmico (50°C) por 20 min, enquanto o controle negativo (CN) consistiu apenas de inóculo bacteriano e meio de cultivo.

Após os tratamentos, as células foram coradas com os corantes fluorescentes DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) e IP (iodeto de Propídio). DAPI é capaz de penetrar nas células bacterianas, colorido artificialmente por um tom azulado em micrografias de fluorescência, enquanto o IP é incapaz de penetrar em células nas quais a membrana está intacta, penetrando apenas em células com membranas permeabilizadas, o que é indicado pela coloração artificial rósea nas micrografias de fluorescência. As células foram então observadas em um microscópio (Olympus BX61) equipado com uma câmera monocromática Orca Flash 2.8 (Hamamatsu, Bridgewater, EUA), através do software CellsSens Dimension (Olympus, Tóquio, Japão). A análise foi feita pelo software Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012) para avaliar o número de células cuja membrana foi

permeabilizada. O experimento foi realizado em três eventos independentes e uma média de 200 células contabilizadas por experimento. As diferenças na quantidade de células permeabilizadas após os tratamentos foram analisadas estatisticamente através de uma análise de variância (ANOVA) seguida de um teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$).

3.7. Potencial dos OEs em reduzir a formação de lesões do cancro cítrico

Para atestar a capacidade dos OEs em reduzirem o surgimento de lesões em folhas de citrus um ensaio de aspersão protetivo foi realizado de acordo com Zamuner *et al.* (2023). O ensaio foi realizado em uma casa de vegetação com aferições diárias de temperatura e umidade (higrômetro digital HOB0 MX2305 (ONSET, Bourne, EUA), entre os meses de novembro e dezembro de 2020. Foram utilizadas mudas de laranjeira pera (*Citrus sinensis* com porta-enxerto de limão cravo (*Citrus limon* (L.) Osbeck)). As mudas foram acondicionadas em sacos plástico (7 L) contendo o substrato *Multiplant Citrus* (Terra do Paraíso, Holambra, SP, Brasil). A casa de vegetação continha sistema de irrigação automatizada (200 mL por planta por dia) e a água foi suplementada com fertilizante mineral *Citrus 100* (Amazon Agrosience, São Carlos, SP, Brasil).

O controle positivo (CP) consistiu no agroquímico *Difere* (Oxíquímica Agrociência, Jaboticabal, SP, Brasil), cujo agente ativo é o oxicloreto de cobre ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$), a uma concentração de 20 mL.L^{-1} , sugerida pela bula para tratamento; e o controle negativo (CN) consistiu em uma solução de tampão fosfato-salino (PBS 1X, v/v). Os OEs de Orégano e Capim limão foram testados em suas Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM), concentrações nas quais, em testes *in vitro*, apresentaram completa inibição de crescimento da *X. citri*. O inóculo foi bacteriano foi preparado de acordo com o item 3.3., e padronizado para aproximadamente para aproximadamente 10^8 células por mL em PBS 1X (v/v).

Para cada tratamento, três mudas contendo folhas jovens com aproximadamente 4 cm de largura e 10 de comprimento foram selecionadas (Cifuentes-Arenas *et al.*, 2018), os galhos foram marcados em cada muda para reconhecimento futuro. Os tratamentos foram aspergidos em todas as folhas da muda até o ponto de escorrimento. Após 24h da aplicação dos tratamentos, o inóculo bacteriano padronizado previamente foi aplicado em todas as plantas de maneira similar. As plantas então foram recobertas com sacos plásticos transparentes por 24 h para manutenção da umidade, abertura dos estômatos, e consequentemente a possível infecção bacteriana.

Após 40 dias de tratamento as folhas dos ramos marcados foram removidas e digitalizadas. Com o auxílio do *software ImageJ Fiji* (Schindelin *et al.*, 2012) foi calculada uma razão entre o número de lesões pela área foliar de cada folha (lesão/cm²). Os dados obtidos foram considerados como não normais e não homogêneos segundo teste de Shapiro-Wilk. A significância entre as amostras foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn. Um nível de confiança de 95% foi considerado.

3.8. Avaliação da capacidade sanitizante das formulações em limas ácidas

Após a seleção dos OEs e sua formulação estes foram avaliados quanto sua capacidade de frutos previamente contaminados com a bactéria *X. citri*, como proposto em Zamuner *et al.* (2020). Para tal foram utilizadas limas ácidas ‘Tahiti’ orgânicas (*Citrus x latifolia*), e não previamente tratadas, fornecidas pela empresa parceira Andrade Sun Farms (Mogi Mirim, SP, Brasil). Previamente ao teste, os frutos passaram por processo de lavagem e higienização para remoção de sujidades. Inicialmente os frutos foram lavados em água corrente, em seguida foram submersos em solução de hipoclorito de sódio comercial (3%) por 5 minutos, e finalmente lavados com água destilada estéril. Os frutos foram então dispostos sobre papel em bancada por 16 h em temperatura ambiente para sua secagem (Figura 3).

Figura 3. Foto de limas ácidas ‘Tahiti’ (*Citrus x latifolia*) utilizados no ensaio



Fonte: Elaborado pelo autor

Na sequência, os frutos foram aspergidos com o inóculo bacteriano padronizado a D.O. de 0.4 (a 600 nm) e reposicionados de modo que toda sua superfície fosse recoberta pelo inóculo e deixados para secar por aproximadamente 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os frutos foram aspergidos (Figura 4). A fim de simular condições encontradas nas linhas de beneficiamento, as frutas foram aspergidas, com os tratamentos e controle, por dois minutos e mantidas em constante agitação sobre peneiras para escoamento do excesso do produto. Após aplicação as frutas foram submetidas à secagem em ar frio com soprador de ar por um minuto, com o objetivo de remover o excesso de produto aderido à sua superfície. Como controle negativo (CN) foi utilizada solução salina (NaCl 0.85%, v/v) e como controle positivo (CP) foi utilizado ácido peracético ($C_2H_4O_3$) a 25 ppm, uma alternativa comercial já disponível no país e utilizada

no processo de sanitização de frutos e vegetais (Behlau *et al.*, 2021). Como comparativo, a formulação original (FO) foi utilizada em sua concentração de uso pela empresa.

Figura 4. Processo de aspersão de frutos durante o ensaio de sanitização



Fonte: Elaborado pelo autor

Após os tratamentos, os frutos foram transferidos para sacos plásticos contendo 50 mL de solução salina (NaCl 0.85%, v/v) e manuseados por cinco minutos com objetivo de recuperar as células bacterianas aderidas à superfície da casca. Em seguida o líquido obtido foi transferido para tubos graduados (50 mL) e submetidos à centrifugação para formação de *pellets* (4000 x g por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado propriamente e as células ressuspensas em 1 mL de solução salina (NaCl 0.85%, v/v). Aliquotas foram coletadas e diluídas em série (10^1 e 10^2), e inoculadas através de técnicas de espalhamento (*spread-plate*) em placas contendo meio de cultivo NYG sólido acrescido dos antibióticos: Kasugamicina (16 mg.L^{-1}), Cefalexina (16 mg.L^{-1}) e Ciclohexamida (50 mg.L^{-1}) com objetivo de reduzir contaminações. As placas foram então

incubadas em B.O.D. à 29°C, por 96 h. Após o período de incubação, foi possível a contagem de CFU da bactéria *X. citri* para avaliação da capacidade de sanitização dos frutos.

Cada tratamento consistiu em três frutos, e cinco repetições, totalizando 15 limões por tratamento. O experimento foi repetido em três eventos distintos. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis., seguido do teste *post-hoc* de Duun, com 95% de confiabilidade.

3.7.1. Diferenciação dos morfotipos bacterianos

Mesmo após as etapas prévias de higienização e adição de antibióticos no meio de cultivo utilizado, a presença de microrganismos como bactérias e leveduras com colônias de morfologia similar às de *X. citri* tornou necessária a realização de um PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Diagnóstico de morfotipos selecionados e comumente encontrados no ensaio. O ensaio foi realizado a partir de colônias isoladas e comparadas com a linhagem utilizada nos experimentos (wt306), sequenciado por Da Silva *et al.* (2002). Os primers utilizados foram Xac 1 (5'-CGCCATCCCCACCACCACGAC) e Xac 2 (5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA) para a amplificação do fragmento de 581 pares de bases, como descrito por Coletta-Filho *et al.* (2006). Para a reação de PCR foram utilizados 0.5 U de Taq DNA polimerase, 05 M de cada primer, 100 M de dNTPs e tampão de enzima como recomendado pelo fabricante (Thermo-Scientific). O ciclo de PCR consistiu em: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguidos de 35 ciclos de 92°C por 40 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C por 45 segundos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0.7% em 1X TBE) de acordo com Sambrook *et al.* (1989) (Da Silva *et al.*, 2002).

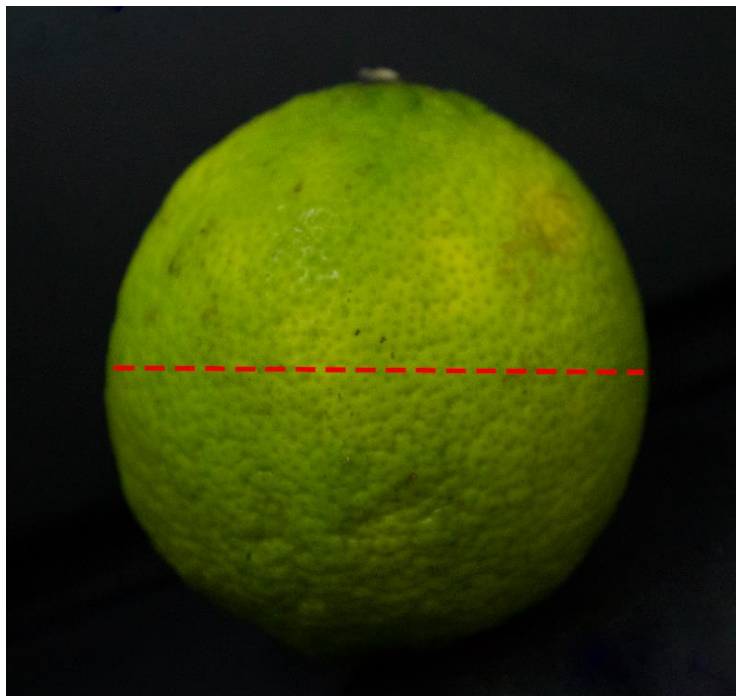
3.9. Avaliações físicas dos frutos após aplicação dos tratamentos

Para avaliar os efeitos físicos dos tratamentos nos frutos, as limas ácidas ‘Tahiti’ foram submetidas aos mesmos processos de aspersão dos tratamentos, como descrito no item 3.8. No entanto, neste caso, não foi realizada a aplicação dos inóculo bacteriano sob os frutos. Após a aplicação dos tratamentos, com o objetivo de simular o processo de transporte internacional dos frutos, os grupos de limões foram acondicionados em recipientes plásticos cobertos, para evitar a entrada de luz, mas que ainda permitissem a passagem de ar. Estes foram mantidos em câmara fria (aprox. 10°C) por 30 dias, período similar ao tempo de transporte (27 dias). A cada 10 dias, os frutos foram fotografados e analisados com relação a alterações visuais em suas cascas. Para cada tratamento foram utilizados grupos de 5 frutos.

Inicialmente, as formulações foram avaliadas em simulação realizada em laboratório e selecionadas quanto aos seus efeitos nas cascas de limões-Taiti comparados a sua capacidade de sanitização. Em etapas posteriores, as formulações selecionadas como potenciais produtos foram utilizadas em um novo ensaio de maior escala.

O ensaio foi realizado na *packing-house* da empresa Andrade Sun Farms, em linhas de beneficiamento de frutos. Para cada tratamento foram utilizados cerca de 200 limões-Taiti, submetidos aos processos padronizados utilizados na empresa. De cada tratamento, 40 frutos foram selecionados aleatoriamente e acondicionados em caixas de papelão utilizadas para exportação. Os frutos foram fotografados com 0, 15 e 30 dias, e quaisquer características como manchas, lesões, contaminações foram relatadas. Ademais, foram realizadas aferições em relação ao peso (g), com auxílio de uma balança digital, e ao diâmetro (mm) dos frutos utilizando um paquímetro manual (Figura 5). Durante o processo, os frutos foram armazenados em câmara fria industrial (aprox. 10°C), na sede da empresa parceira.

Figura 5. Foto de frutos durante a avaliação de suas características físicas. Linha tracejada em vermelho destaca os pontos para aferição do diâmetro do fruto.



Fonte: Elaborado pelo autor

Durante a realização dos experimentos, parte dos frutos perde seu pedúnculo, expondo o interior do fruto ao ambiente, o que pode levar a incidência de outros patógenos. Com objetivo de avaliar se as formulações pudessem ter efeitos no desenvolvimento de outros microrganismos, número de limas ácidas “Tahiti” com crescimento fúngico visível na região da base do pedúnculo foi contado.

4.Resultados

4.1. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais contra *X. citri*

Os dados obtidos na etapa de triagem são apresentados na Tabela 2. São considerados os mais eficientes os OEs cujo valor da CBM é menor em comparação com demais óleos.

Tabela 2. Óleos Essenciais e suas Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) para a bactéria *X. citri*

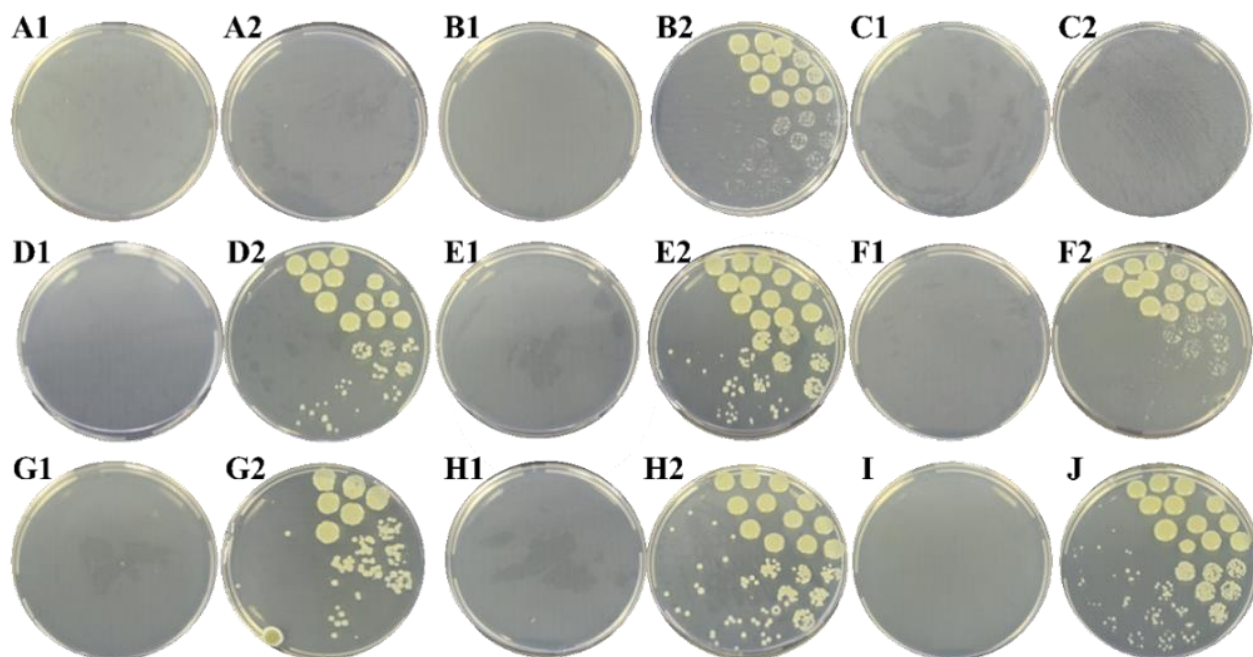
Espécie	Nome popular	CBM %	Espécie	Nome popular	CBM %
<i>Citrus Limonum</i>	Limão siciliano	> 0.5	<i>Lavandula stoechas</i>	Rosmaninho	0.25
<i>Citrus Sinensis</i>	Laranja doce	> 0.5	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca	0.5
<i>Cymbopogon Flexuosus</i>	Capim limão	0.03	<i>Menta x piperita</i>	Hortelã	0.25
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa	0.06	<i>Ocimum basilicum</i>	Manjerição	0.06
<i>Cymbopogon Nardus</i>	Citronela	0.06	<i>Origanum Vulgare</i>	Orégano	0.03
<i>Coriandrum Sativum</i>	Coentro	0.125	<i>Pelargonium roseum</i>	Gerânio	0.06
<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto limão	0.06	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	0.25
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	0.125	<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo	0.06

Concentração em % (v/v). Fonte: Elaborado pelo autor

Dos 16 OEs testados, 9 apresentaram atividade bactericida entre as duas menores concentrações testadas (0.06 e 0.03%, v/v) (Figura 6). Os óleos de Citronela, Cravo, Eucalipto limão, Gerânio, Manjerição e Palmarosa apresentaram atividade bactericida na concentração de

0.06% (v/v), enquanto os óleos de Capim limão e Orégano apresentaram atividade bactericida na menor concentração testada (0.03% v/v), sendo assim, estes dois óleos foram selecionados para a próxima etapa.

Figura 6. Placas obtidas após os tratamentos com óleos essenciais (OEs) e o período de incubação de 72 h.



A1: Orégano 0.06%; A2: Orégano 0.03%; B1: Palmarosa 0.06%; B2: Palmarosa 0.03%; C1: Capim Limão 0.06%; C2: Capim Limão 0.03%; D1: Gerânio 0.06%; D2: Gerânio 0.03%; E1: Eucalipto Limão 0.06%; E2: Eucalipto Limão 0.03%; F1: Manjeriçã 0.06%; F2: Manjeriçã 0.03%; G1: Citronela 0.06%; G2: Citronela 0.03%; H1: Cravo 0.06%; H2: Cravo 0.03%; I: CP; J: CN. Fonte: Elaborado pelo autor

4.2. Composição dos óleos essenciais (OE) de orégano e de capim-limão

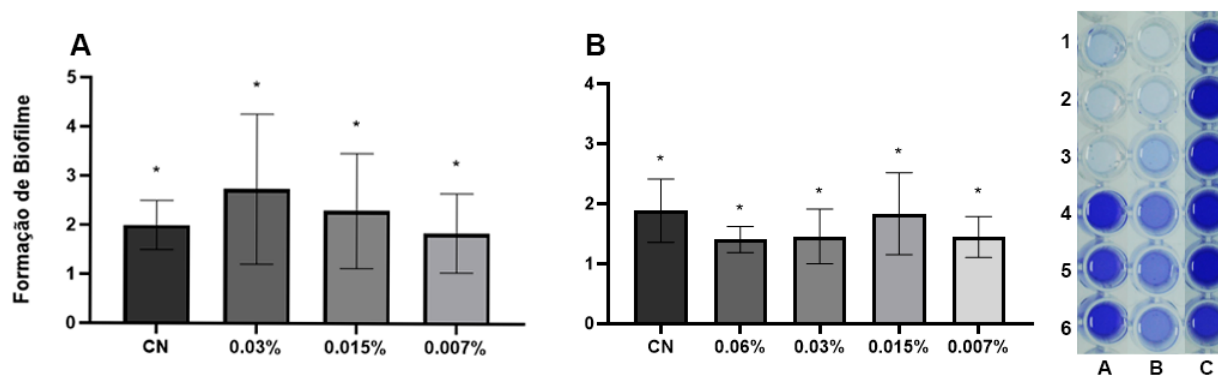
O OE de orégano tem como componentes principais os compostos carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) e timol (5-metil-2-(1-metiletil) fenol), nas concentrações de aproximadamente 71% e 3%, respectivamente. O OE de capim-limão é composto majoritariamente pelo citral (3,7-

dimethyl-2,6-octadienal), dividido entre dois aldeídos isoméricos Neral (cis-citral) e Geranial (trans-citral), com 34% e 45%, respectivamente.

4.3. Interferência dos óleos essenciais de orégano e capim-limão na formação de biofilme de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Os dados obtidos (Figura 7), revelaram que os OEs de orégano e capim-limão não tiveram efeito significativo na redução do biofilme bacteriano de *X. citri*. Em concentrações superiores a 0.03% (v/v) (OE de Orégano) e 0.06% (v/v) (OE de Capim limão) não houve crescimento bacteriano, porém ao avaliarmos concentrações inferiores (sub-inibitórias), os índices de formação de biofilme não se diferenciaram significativamente ($p > 0,05$) do controle negativo (CN) utilizado.

Figura 7. Formação de Biofilme pela bactéria *X. citri* na presença dos óleos essenciais de Orégano e Capim limão.

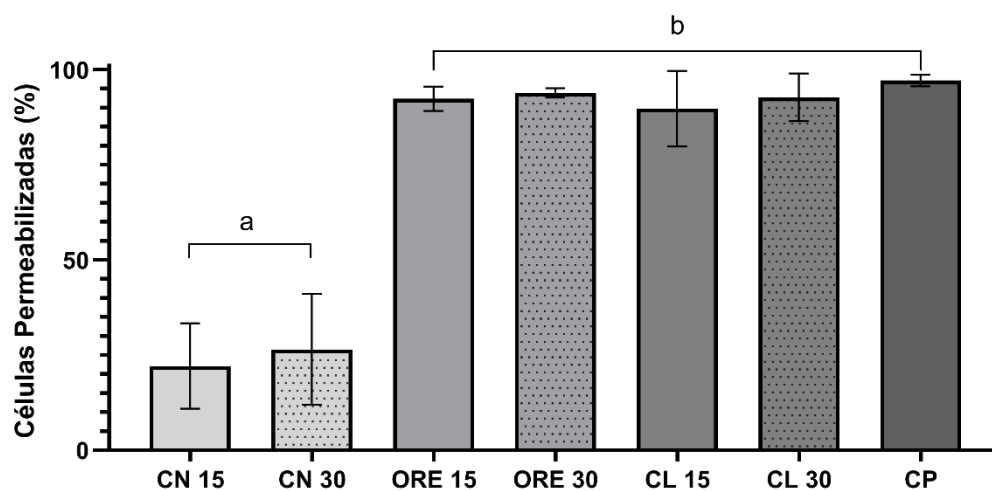


Formação de biofilme (Absorbância_{590nm}/D.O._{600nm}). A: tratamentos com Óleo essencial (OE) de orégano, B: tratamentos com OE de capim-limão. C e CN: Controle Negativo. *: representa a similaridade entre os tratamentos ($p > 0,05$). Número de 1 – 6 representam as concentrações (0.25%; 0.125%; 0.06%; 0.03%; 0.015% e 0.07% (v/v), respectivamente). Barras de erro representam desvio padrão da média.

4.4. Efeitos dos óleos essenciais de orégano e capim-limão na permeabilização da membrana celular de *X. citri*

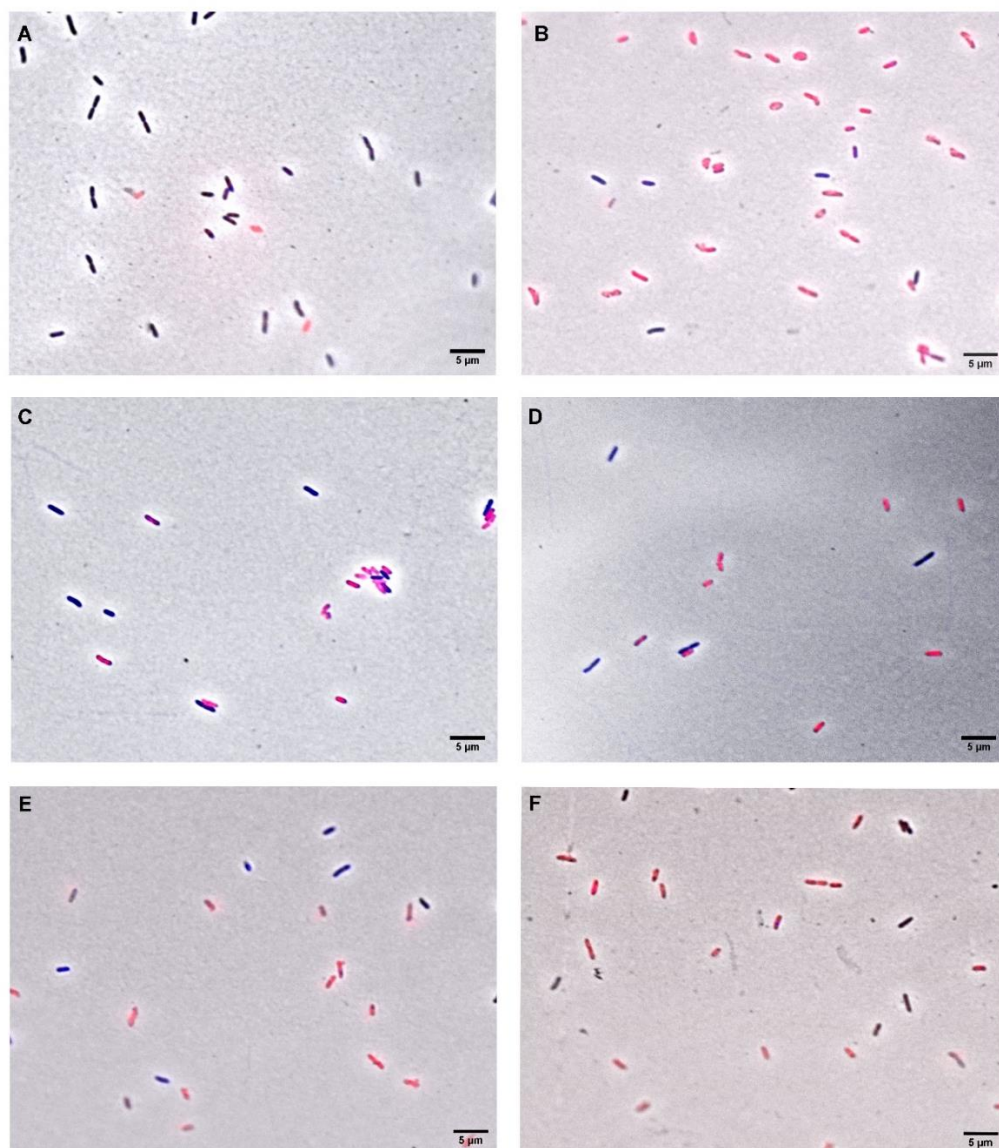
Para investigar possíveis alvos dos OEs de orégano e capim-limão na célula bacteriana, células de *X. citri* foram expostas aos óleos em suas concentrações bactericidas (0.03%, v/v) e observadas sob microscópio. Após a incubação de células de *X. citri* com OEs de orégano e capim-limão, foi possível observar resultados semelhantes, entre os tratamentos com 15 minutos e 30 minutos de duração (Figura 8 e 9). O OE de O=orégano mostrou um efeito similar entre os tratamentos de 15 e 30 minutos, com uma média de 92.3% e 93.9%, respectivamente. O OE de capim-limão apresentou um leve aumento no número de células permeabilizadas entre os tempos de 15 minutos (89.7%) e 30 minutos (92.7%), ainda assim, não houve diferença significativa tanto entre os tratamentos quanto em relação ao CP (97.1%) ($p > 0.05$). Já em relação ao CN (22.1% com 15 minutos e 26.5% com 30 minutos), foi observada diferença significativa com os tratamentos e CP. Ademais, as células avaliadas não apresentaram nenhuma diferença morfológica e nenhuma aglutinação celular foi observada em nenhum dos tratamentos. Após 30 minutos de contato, não observada nenhuma diferença significativa entre o tamanho das células tratadas: CN30: 1,55 μm (Desvio Padrão (DV) = 0,49); ORE30: 1,63 μm (DV = 0,32) e CL30: 1,55 μm (DV = 0,43).

Figura 8. Porcentagem de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* permeabilizadas após 15 e 30 minutos de contato com os óleos essenciais de orégano e capim-limão



Letras minúsculas (*a* e *b*) simbolizam agrupamentos de grupos similares entre si ($p > 0.05$) de acordo com teste de Tukey. ORE: Óleo essencial de orégano; CL: Óleo essencial de capim-limão; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Barras de erro simbolizam desvio padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9. Micrografias de fluorescência obtidas durante ensaio de *Live-Dead* com células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* após 15 e 30 minutos de contato com os óleos essenciais de orégano e capim-limão.

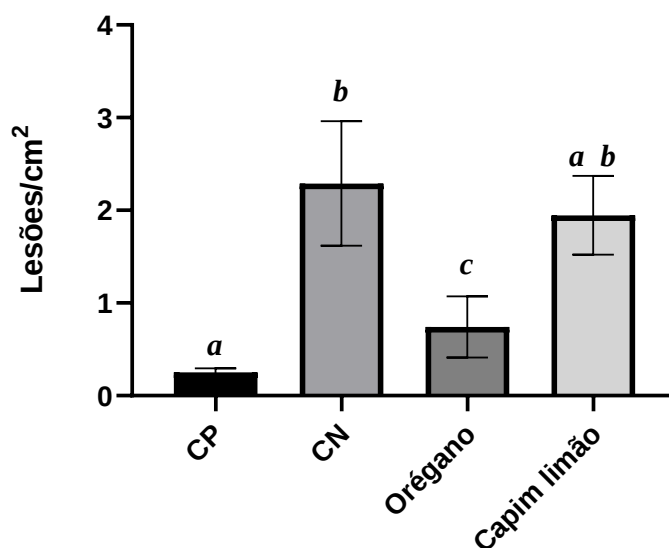


A: Controle Negativo após 30 minutos; B: Controle Positivo após 30 minutos; C e D: Células tratadas com óleo essencial de orégano após 15 e 30 minutos, respectivamente; E e F: Células tratadas com óleo essencial de capim-limão após 15 e 30 minutos, respectivamente. Células com membranas permeabilizadas estão coloridas artificialmente em vermelho (Iodeto de Propídio) enquanto células com membranas intactas estão coloridas artificialmente em azul (DAPI). Escala de 5 µm. Magnificação de 100x. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5. Avaliação da capacidade protetiva dos óleos essenciais de orégano e capim-limão em mudas de *Citrus sinensis*, contra a formação de lesões de cancro cítrico.

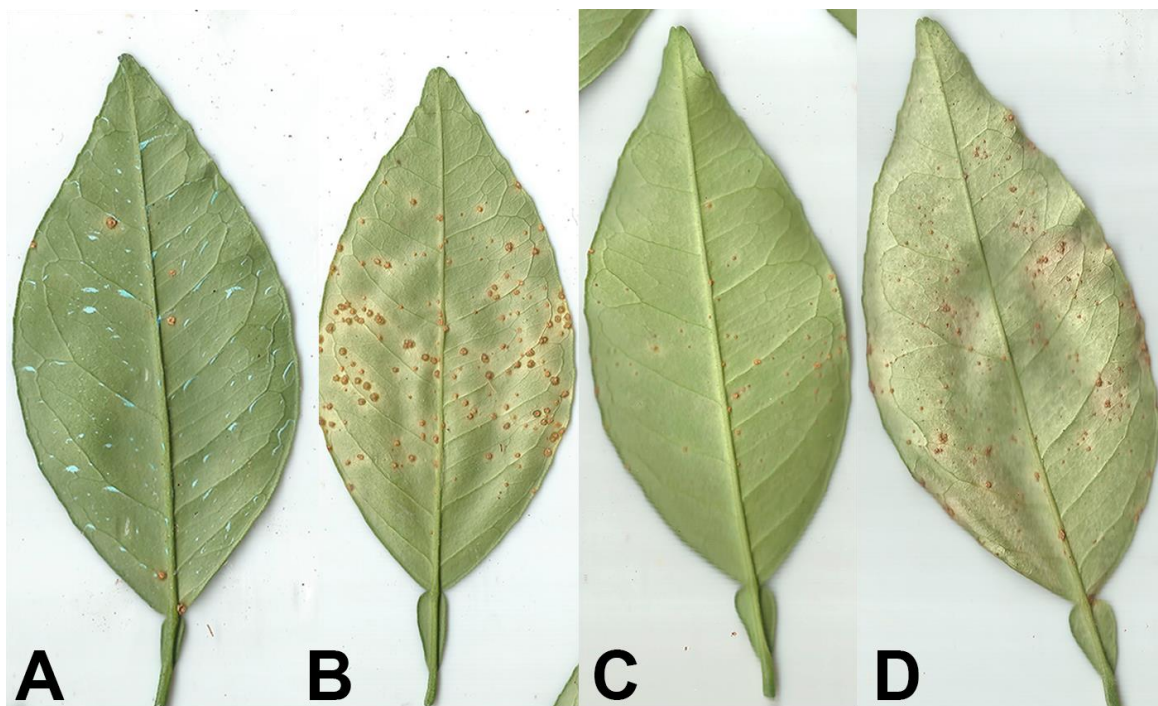
Os resultados obtidos revelam que o OE de orégano, testado em sua CBM (0.03%), foi capaz de reduzir significativamente a formação de lesões de cancro cítrico (0.74 lesões/cm², Erro Padrão (SE) = 0.3), quando comparado ao CN (2.29 lesões/cm², SE=0.6), ainda que de maneira menos eficiente do que o CP (0.25 lesões/cm², SE=0.04). O OE de capim-limão (0.03%) (1.94 lesões/cm², SE=0.4) por sua vez, foi capaz de reduzir o número de lesões quando comparado ao CN, no entanto, de maneira não significativa. Este mesmo tratamento se agrupou estatisticamente com ambos os controles, possivelmente devido ao alto desvio padrão entre o número de lesões por cm² apresentado pelo tratamento.

Figura 10. Número de lesões de cancro cítrico por cm² em folhas de *Citrus sinensis* após 40 dias da aplicação dos tratamentos.



CP: Controle positivo, CN: Controle negativo. Letra “a” representa conjuntos de dados semelhantes ao controle positivo. Letra “b” representa conjuntos de dados semelhantes ao controle negativo. Barras de erro mostram erro padrão. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11. Folhas de *Citrus sinensis* apresentando sintomas de cancro cítrico causados pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* após 40 dias da aplicação dos tratamentos do OEs de orégano e capim-limão.

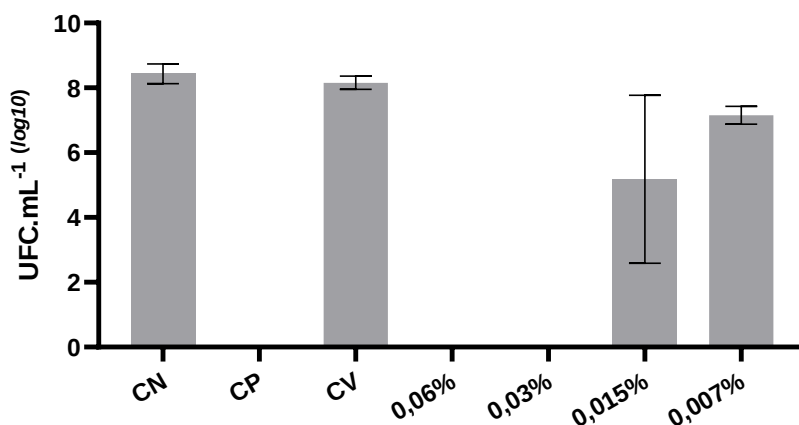


A: Controle positivo, B: Controle negativo C: OEs de Orégano (0.03%, v/v), D: OEs de Capim limão (0.03%, v/v)

4.6. Óleos essenciais de orégano e capim-limão como princípios ativos da formulação.

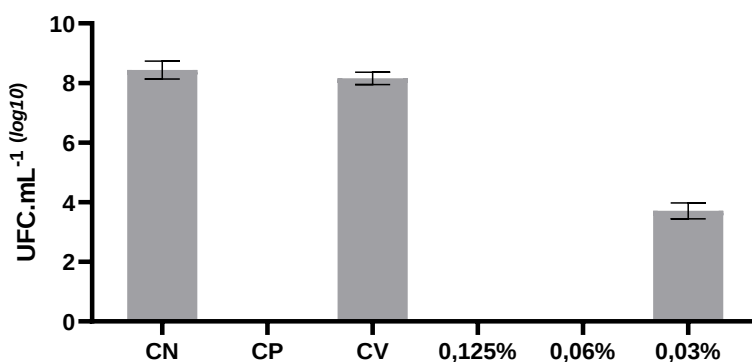
Após o período de incubação, foi possível observar que as três formulações foram capazes de inibir o crescimento da bactéria alvo em diferentes concentrações (Figuras 12, 13 e 14) após 4 horas de contato, semelhante ao CP.

Figura 12. Inibição do crescimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pela formulação contendo óleo essencial de orégano como princípio ativo.



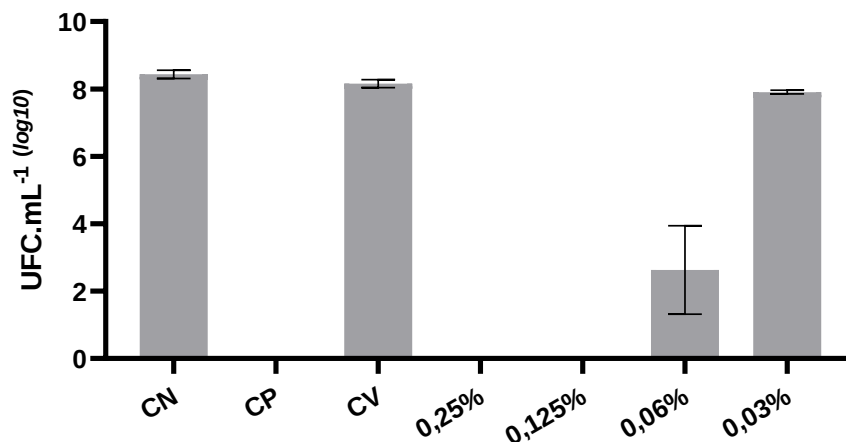
Valores expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL em $\log_{10}$. CN: Controle negativo; CP: controle positivo e CV: Controle de Veículo. Concentrações em % (v/v). Barras de erro representam desvio padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13. Inibição do crescimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pela formulação contendo o óleo essencial de capim-limão como princípio ativo.



Valores expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL em $\log_{10}$. CN: Controle negativo; CP: controle positivo e CV: Controle de Veículo. Concentrações em % (v/v). Barras de erro representam desvio padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 14. Inibição do crescimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pela formulação original (FO).



Valores expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL em $\log_{10}$. CN: Controle negativo; CP: controle positivo e CV: Controle de Veículo. Concentrações em % (v/v). Barras de erro representam desvio padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor

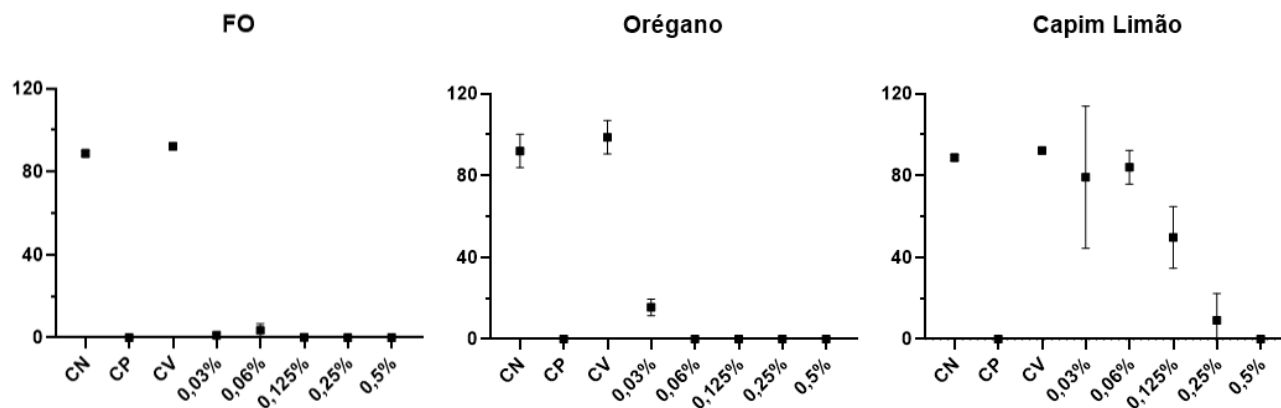
Os resultados mostram que os OEs de orégano e capim-limão apresentaram concentrações inibitórias inferiores (0,03%, 0,06% v/v, respectivamente) quando comparados a FO (0,125% v/v). O OE de Capim limão, mesmo apresentando crescimento bacteriano na concentração de 0,03% (v/v), mostrou uma redução de aproximadamente $4 \log_{10}$ no número de CFU.mL⁻¹ quando comparado ao CN ou a FO em mesma concentração.

Para verificar o potencial da formulação contendo OE de orégano, foi necessária sua avaliação em concentrações inferiores (0,015% e 0,007% v/v). Os resultados obtidos confirmaram a concentração bactericida da formulação contendo OE de Orégano como 0,03% (v/v), mostrando crescimento bacteriano similar ao CN em concentrações inferiores. Sendo assim, o OE de Orégano, nas condições apresentadas, se mostrou o princípio ativo com menor CBM.

4.7. Fitotoxicidade das formulações contendo Óleos essenciais de Orégano e Capim limão como princípios ativos em sementes de alface (*Lactuca sativa*) e tomate (*Solanum lycopersicum*)

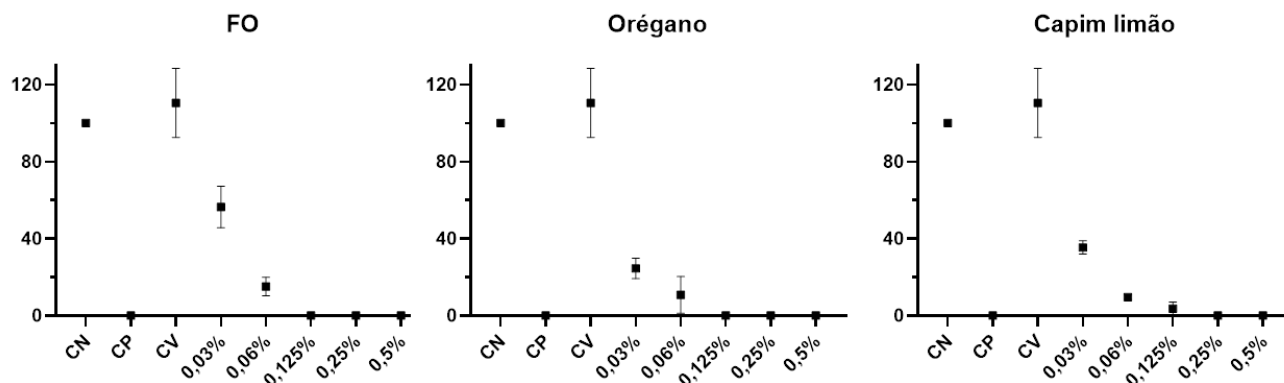
A fitotoxicidade das formulações foi avaliada mediante sua capacidade de inibição da germinação e crescimento de sementes de duas plantas indicadoras, tomate (*Solanum lycopersicum*) e alface (*Lactuca sativa*). Os resultados revelam que todos os princípios ativos formulados possuem efeito tóxico na germinação de ambas as espécies, com efeitos mais severos observados em sementes de alface, notada como a espécie mais suscetível (Figuras 15 e 16). A FO e a formulação contendo OE de Orégano apresentaram efeitos tóxicos em ambas as espécies mesmo na menor concentração avaliada (0.03% v/v).

Figura 15. Índices de Germinação (IG%) da FO, e dos OEs de orégano e capim-limão em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*)



Fonte: Barras de erro representam desvio padrão. Elaborado pelo autor

Figura 16. Índices de Germinação (IG%) da FO, e dos OEs de orégano e capim-limão em sementes de alface (*Lactuca sativa*).



Fonte: Barras de erro representam desvio padrão. Elaborado pelo autor

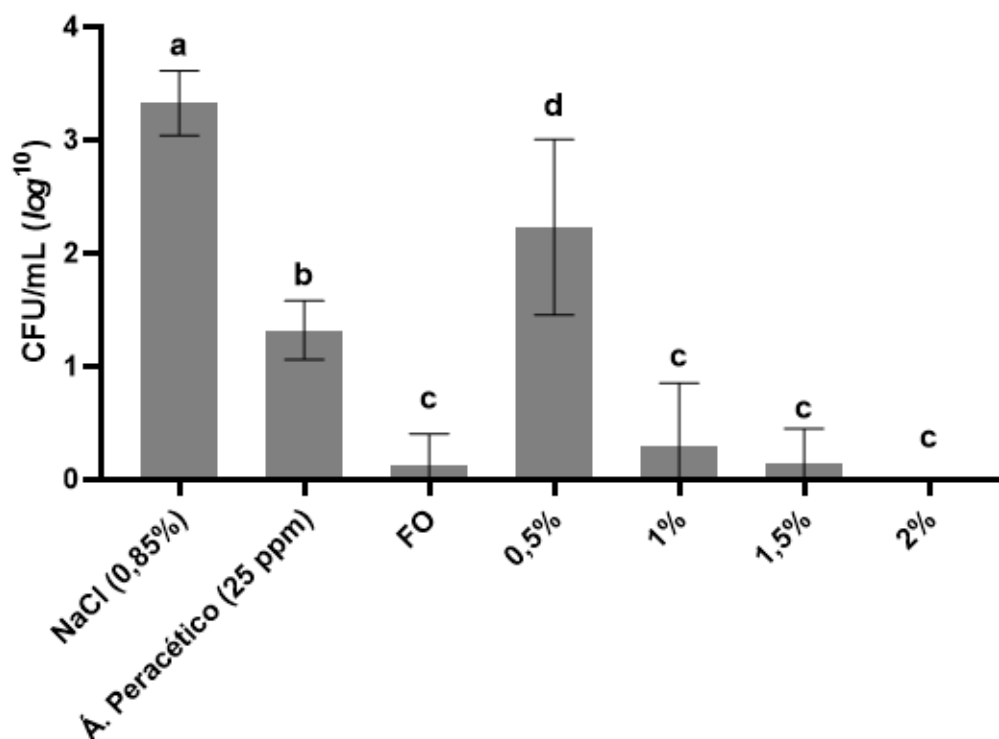
A formulação de Capim Limão apresentou efeitos de neutralidade até a concentração de 0.06% (v/v) em sementes de tomate, mostrando toxicidade acentuada em concentrações subsequentes. O mesmo efeito de neutralidade não foi observado em sementes de alface, onde a formulação se mostrou tóxica já na menor concentração avaliada.

4.8. Sanitização de limas ácidas “Tahiti” por formulações contendo óleos essenciais de orégano e de capim-limão como princípios ativos

Os resultados obtidos revelam que a formulação contendo OE de orégano foi capaz de sanitizar os frutos a quando acrescida de 1% do OE (v/v), reduzindo em $2 \log^{10}$, o número de CFU.mL⁻¹ quando comparado ao controle negativo (NaCl 0,85% v/v) (Figura 17). Os valores obtidos se mostraram similares aos obtidos pela FO, e significativamente menores se comparados aos resultados obtidos com o tratamento com o Ácido peracético (25 ppm). Ainda, a formulação de OE de Orégano foi capaz de remover completamente as células de *X. citri* dos frutos quando

acrescido de 2% (v/v) do OE, denotando uma redução de aproximadamente $4 \log^{10}$ no número de CFU.mL⁻¹.

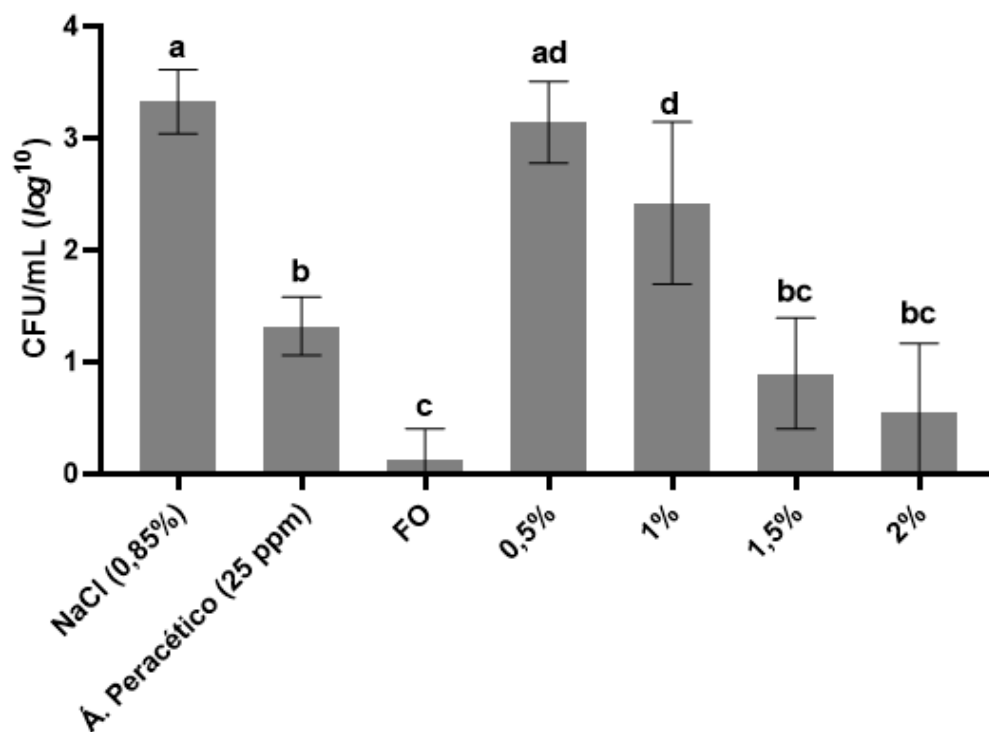
Figura 17. Efeito das formulações contendo óleo essencial de orégano no controle da bactéria *X. citri* em limas ácidas ‘Tahiti’.



Letras atribuídas quanto à similaridade estatística entre os conjuntos de dados obtidos segundo o teste de *Kruskal-Wallis* ($p < 0.05$). Concentrações do tratamento com formulação contendo OE de orégano dispostas em % (v/v). Barras de erro representam desvio padrão. Fonte: Elaborado pelo autor

A formulação contendo OE de capim-limão teve resultados similares à FO e ao Ácido peracético quando acrescida de 1.5% e 2% (v/v) do OE, reduzindo em aproximadamente $2 \log^{10}$ (Figura 18). Em concentrações inferiores de OE, a formulação mostrou atividade reduzida (1% v/v) ou não significativa (0.5% v/v) quando comparada ao controle negativo.

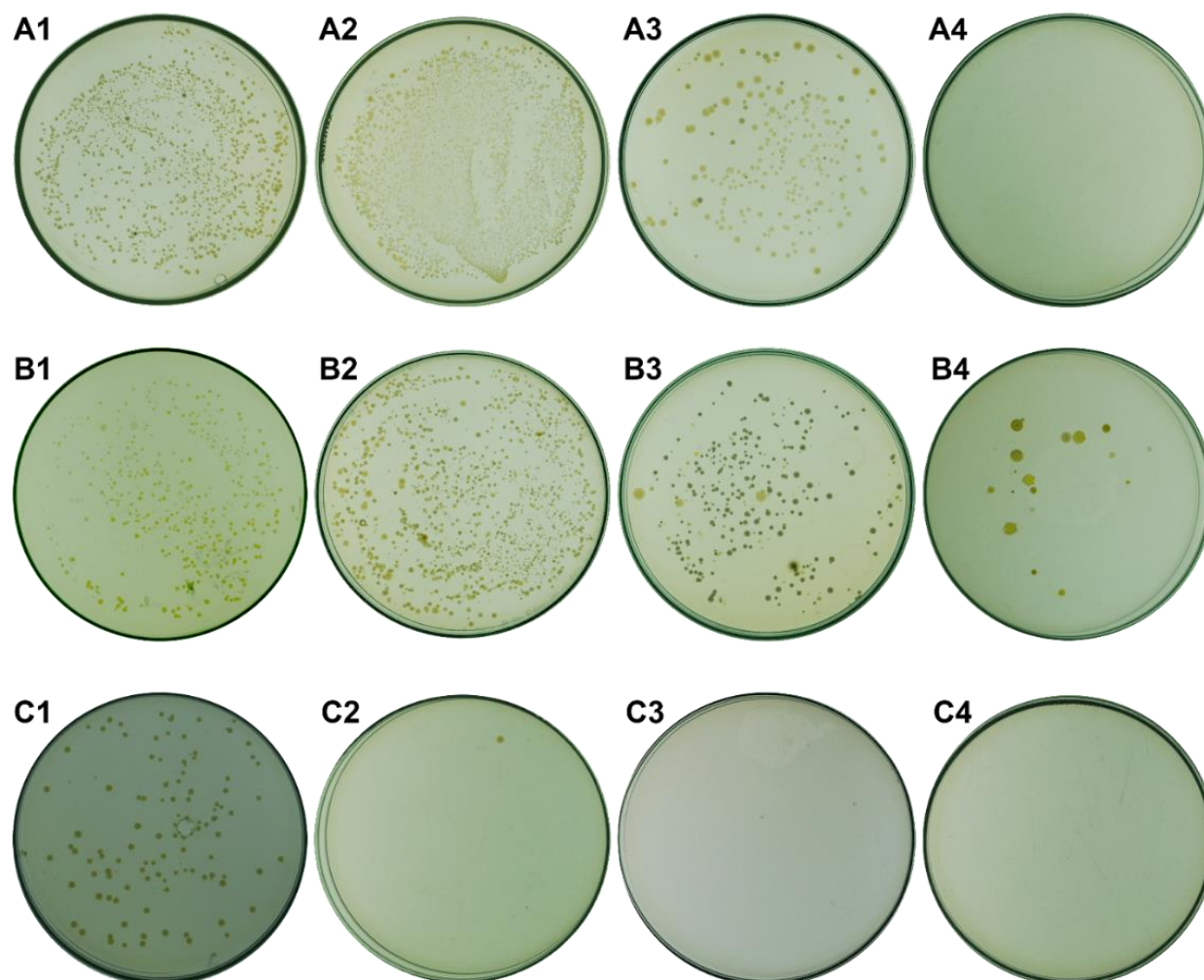
Figura 18. Efeito das formulações contendo óleo essencial de Capim limão no controle da bactéria *X. citri* em limas ácidas ‘Tahiti’.



Letras atribuídas quanto à similaridade estatística entre os conjuntos de dados obtidos segundo o teste de *Kruskal-Wallis* ($p < 0.05$). Concentrações do tratamento com formulação contendo OE de capim-limão dispostas em % (v/v). Barras de erro representam desvio padrão. Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 19 mostra exemplos de placas obtidas após o período de incubação de 96 horas.

Figura 19. Placas obtidas após o processo de sanitização de limas ácidas ‘Tahiti’ e incubação por um período de 96h.



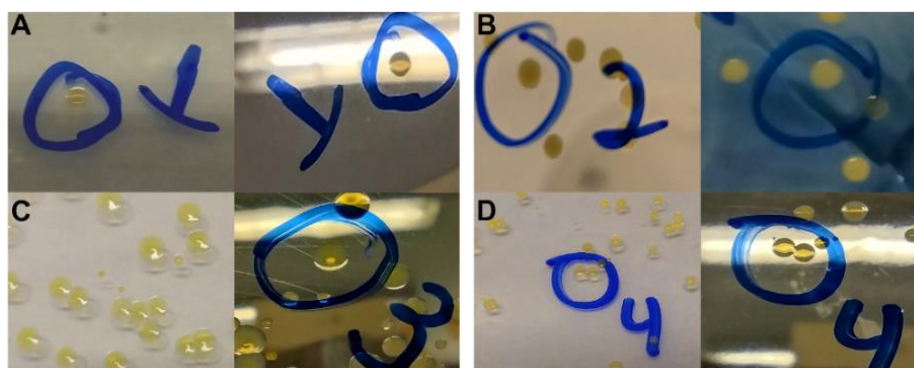
A1: Salina (NaCl 0,85%); A2: CV (2%); A3: Ácido Peracético (25 ppm); A4: FO; B1: Capim Limão (0.5%); B2: Capim limão (1%); B3: Capim Limão (1.5%); B4: Capim Limão (2%); C1: Orégano (0.5%); C2: Orégano (1%); C3: Orégano (1.5%) e C4: Orégano (2%). Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8.1. Diferenciação dos morfotipos bacterianos obtidos

Com o objetivo de ajustar os critérios de contagem e evitar erros nos valores de CFU obtidos nos testes de sanitização, morfotipos bacterianos encontrados após o período de incubação foram selecionados para uma análise via PCR Diagnóstico. A Figura 20 mostra células comumente

encontradas durante a realização dos ensaios, e a Figura 21 mostra os resultados obtidos após o procedimento.

Figura 20. Morfotipos bacterianos encontrados em placas do ensaio de sanitização selecionados para análise via PCR Diagnóstico quanto a similaridade a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21. Gel de Eletroforese dos morfotipos bacterianos encontrados em placas do teste de sanitização de limas ácidas ‘Tahiti’ após período de incubação.



Poços 1: 2: 3: 4: morfotipos selecionados; PM: peso molecular; *X. citri* (wt306); branco. O fragmento diagnóstico característico possui 581 pb. 1 Kb ladder. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos pelo teste de PCR Diagnóstico revelam que os morfotipos 1 e 4 apresentam *amplicons* de 581 pb, característicos de *X. citri* (Coletta-Filho *et al.*, 2006). É possível observar bandas de amplificação inespecíficas no poço 3, ainda, o fragmento diagnóstico está presente, indicando que o morfotipo se trata da bactéria *X. citri*. Já no caso do morfotipo 2 (poço 2) não é possível verificar a presença da banda de 581 bp característica. Como controle positivo,

uma extração do DNA total de *X. citri* (isolado wt 306 (IBSBF 1594)) foi utilizada. A comparação entre os dados obtidos e as características morfológicas das colônias permitiu sua diferenciação com maior clareza. Colônias de *X. citri* apresentam forma circular, elevação convexa, margem inteira, coloração amarelada e são translúcidas à luz.

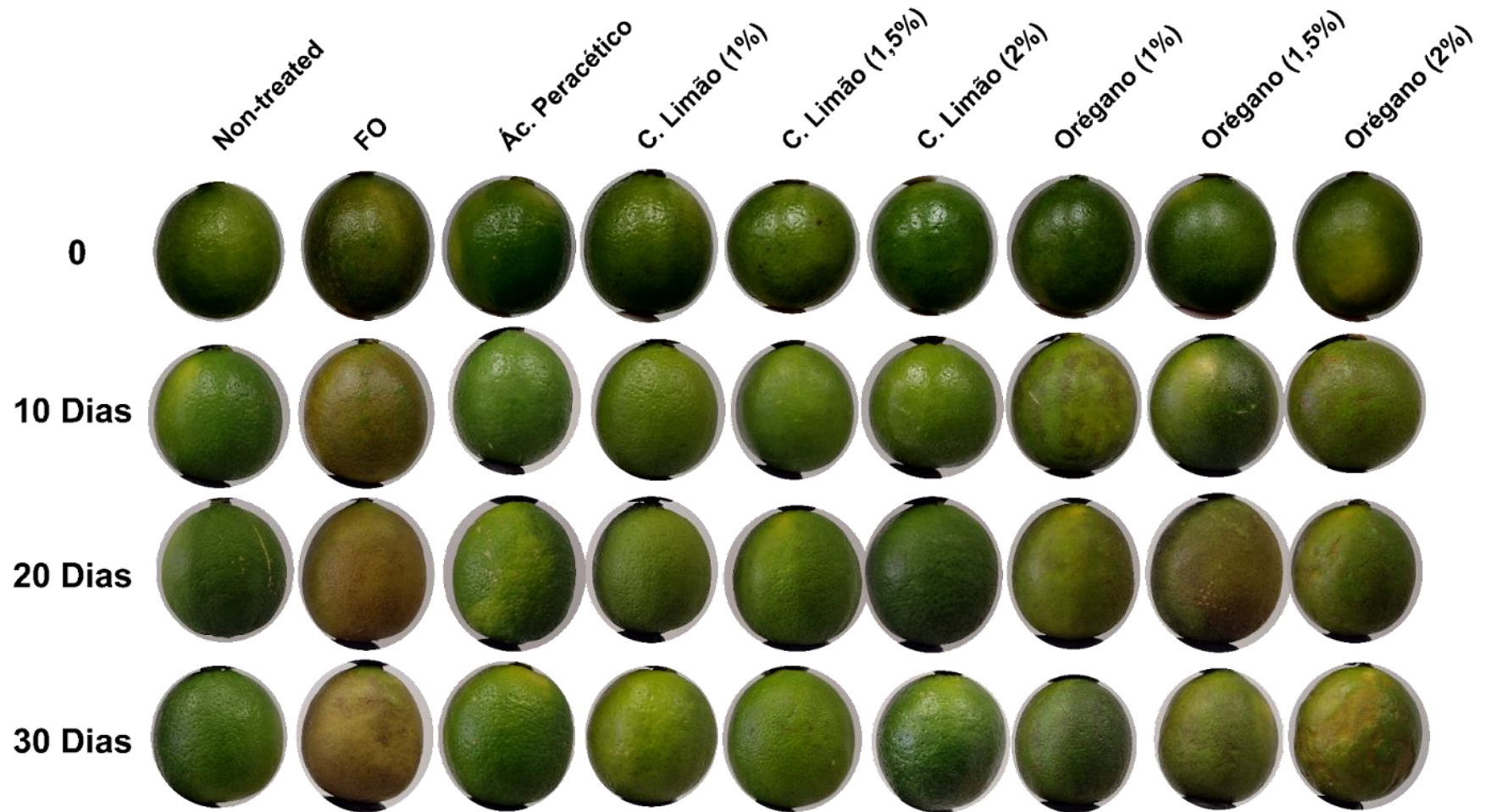
4.9. Avaliação das características físicas de limas ácidas “Tahiti” após aplicação das formulações contendo os OEs de orégano e capim-limão como princípios ativos

4.9.1. Simulação em ambiente de laboratório

Os resultados obtidos mostram que a os frutos tratados com a FO apresentaram sintomas severos de oleocelose a partir do décimo dia (Figura 22). Oleocelose é o nome dado ao aparecimento de manchas causadas pela liberação de óleos essenciais presentes em glândulas nas cascas de frutas cítricas, essa liberação pode ocorrer tanto por danos mecânicos quanto devido a ação química. Efeitos similares podem ser observados nos frutos expostos às formulações contendo OE de orégano nas concentrações de 1.5% e 2% (v/v) a partir do vigésimo dia. As formulações contendo o OE de capim-limão não apresentaram efeitos visíveis nas cascas dos frutos analisados.

Ainda, nota-se que os sintomas pronunciados observados em tratamentos com a FO não são observados durante suas aplicações rotineiras.

Figura 22. Fotos de limas ácidas ‘Tahiti’ após os tratamentos mostrando variações visuais no decorrer de 0 a 30 dias

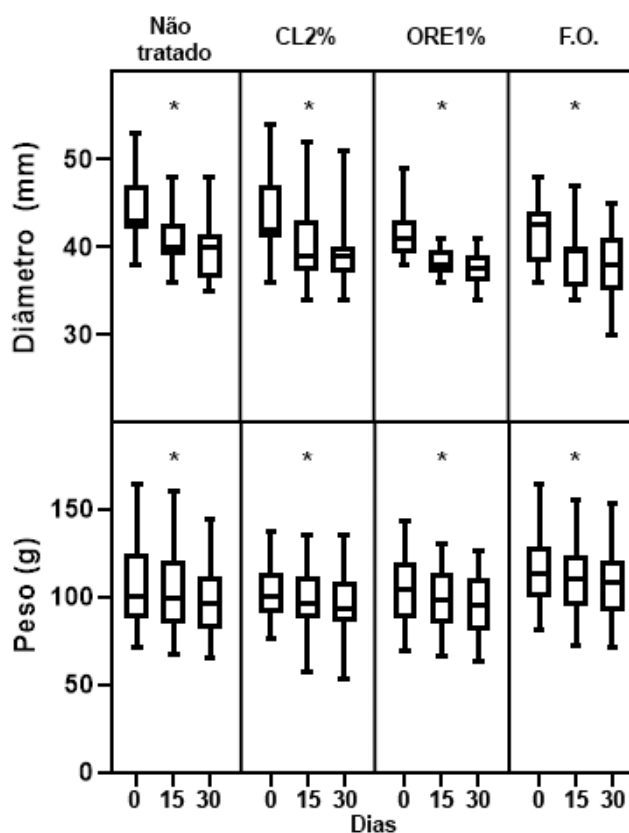


Fonte: Elaborado pelo autor

4.9.2. Ensaio realizado em linha de beneficiamento

A Figura 23 apresenta os resultados da variação de tamanho (mm) e peso (g) nos frutos tratados ao longo de 30 dias. Os dados de diâmetros obtidos revelam uma redução no diâmetro médio dos frutos ao longo do tempo em todos os tratamentos.

Figura 23. Variação do diâmetro (mm) e peso (g) de limas ácidas ‘Tahiti’ após os tratamentos ao longo do período de 30 dias.

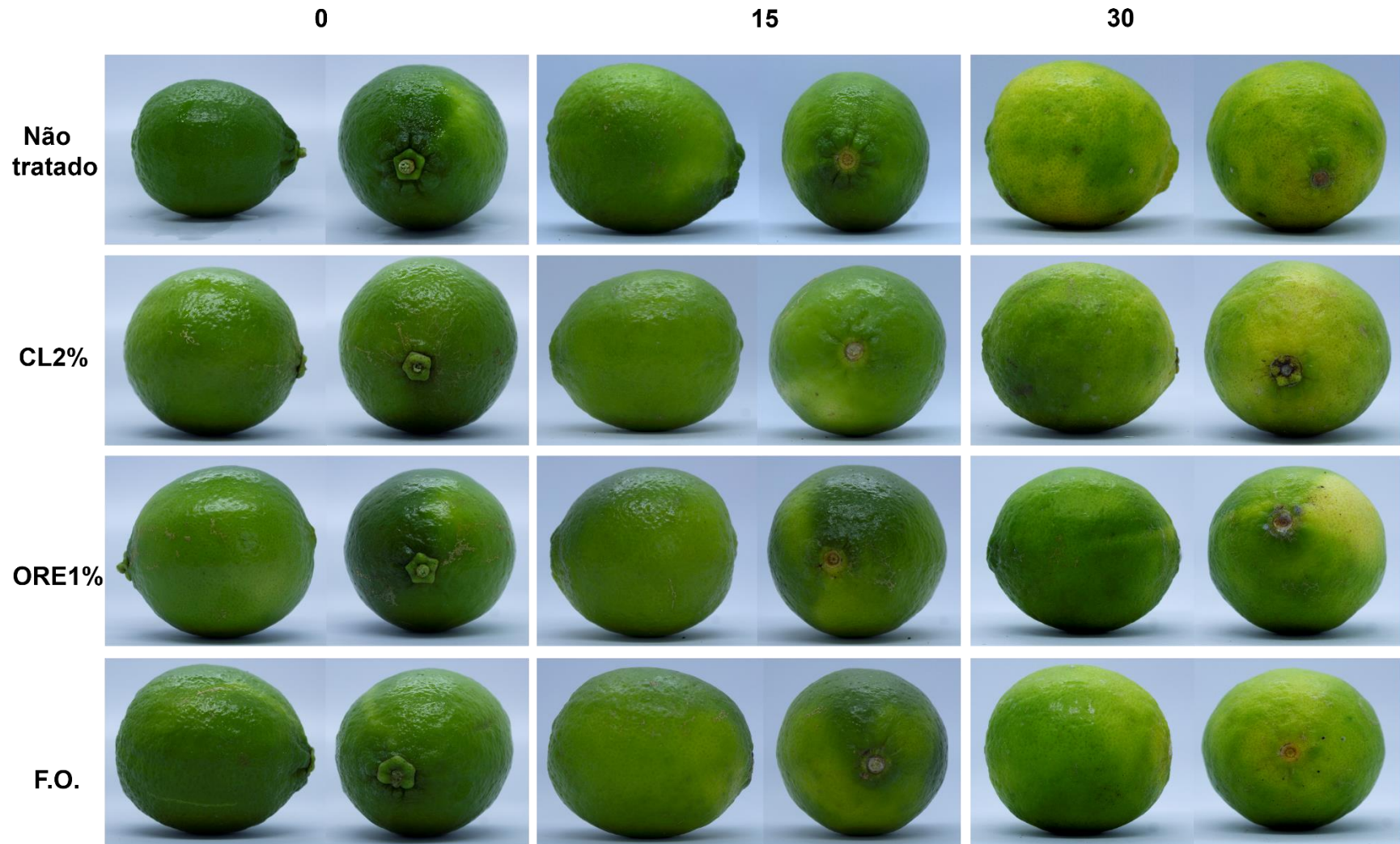


CL2%: Formulação contendo OE de capim-limão à 2% (v/v). ORE1%: Formulação contendo OE de orégano a 1% (v/v). FO: Formulação original utilizada pela empresa. *: sinaliza a ausência de diferença significativa entre as amostragens de um tratamento. Barras de erro significam o desvio padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor

Os frutos não tratados apresentaram uma diminuição de aproximadamente 10,7% em seu diâmetro, comparados a 9.41% da FO, 8.62% da formulação contendo OE de capim-limão (2%, v/v) e 9.95% na formulação contendo OE de orégano. Em relação ao peso, a massa perdida ao final dos 30 dias foi de 7.37% (Não-tratado), 6.69% (FO), 5.15% (Formulação contendo OE de capim-limão (2% v/v)) e 7.78% (Formulação contendo OE de orégano (1% v/v)). Ainda que uma redução no diâmetro possa indicar uma redução em massa fresca é possível notar que as reduções apresentam uma tendência similar em todos os tratamentos, o que serve de indicativo de que os tratamentos propostos não têm uma influência clara na redução de massa fresca dos frutos.

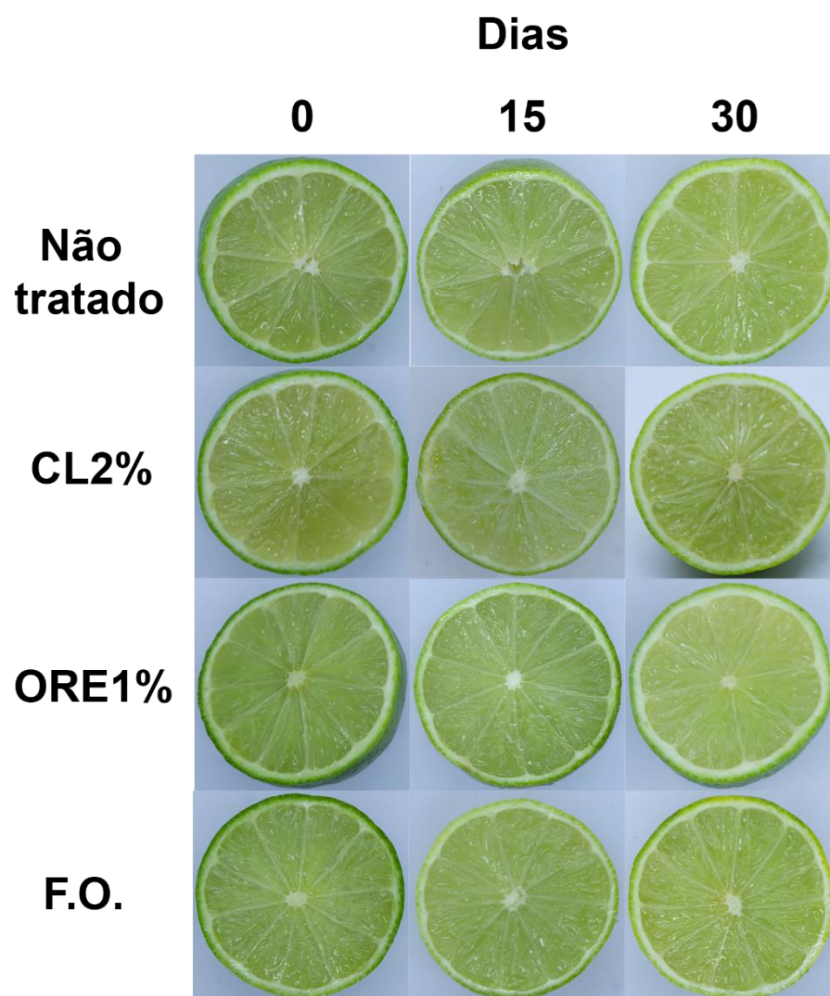
Juntamente as aferições de peso e diâmetro, uma análise visual dos frutos utilizados foi realizada, a fim de apontar quaisquer diferenças visuais que pudessem existir entre os tratamentos. Ao analisar as fotografias (Figura 24), é possível notar diferenças nos resultados obtidos na simulação feita em laboratório e o teste feito em linha industrial de beneficiamento de frutos. As manchas causadas pelos óleos (oleocelose), visíveis a partir do décimo dia em frutos tratados com a FO (Figura 22) não são visíveis no mesmo tratamento realizado em *packing-house*, o que aponta para diferenças entre os métodos de aplicação simulando uma linha de beneficiamento e a aplicação em linha real. Em relação as formulações contendo os OEs de orégano (1%) (ORE1%) e capim-limão (2%) (CL2%), não houveram efeitos visuais significativos se comparados a FO e aos frutos não tratados, tanto nas cascas quanto internamente (Figura 25). Em todos os tratamentos, sinais de amarelecimento dos frutos foram observados aos 30 dias.

Figura 24. Fotos representativas de lima ácidas ‘Tahiti’ ao longo de 30 dias após tratadas com formulações contendo OEs de orégano (ORE1%), Capim limão (CL2%) e a Formulação Original (FO).



Fonte: Elaborado pelo autor

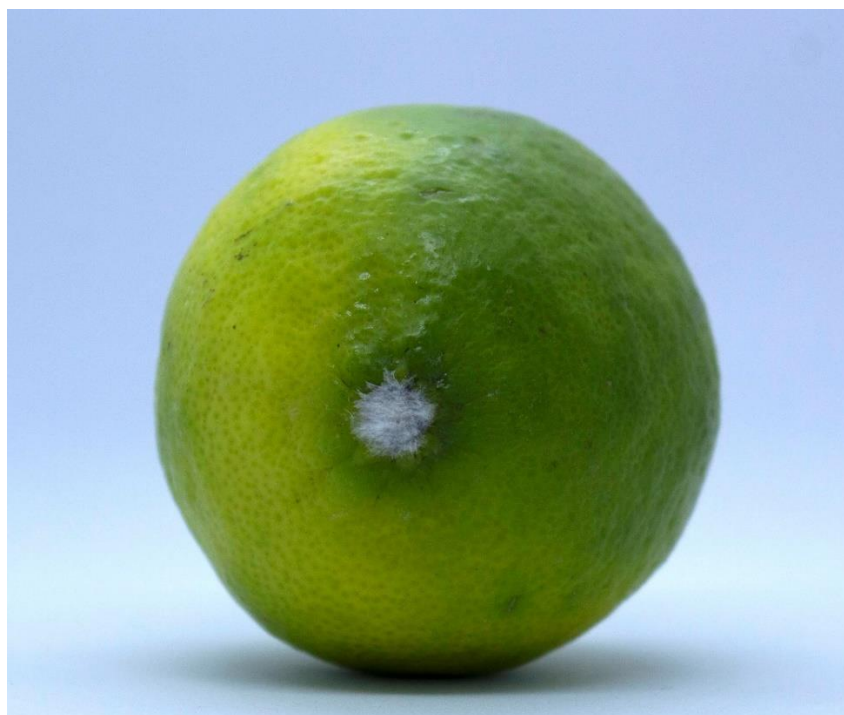
Figura 25. Fotos representativas do interior de limas ácidas ‘Tahiti’ ao longo de 30 dias após os tratamentos



CL2%: Formulação contendo OE de capim-limão à 2% (v/v). ORE1%: Formulação contendo OE de orégano a 1% (v/v). FO: Formulação original utilizada pela empresa. Fonte: Elaborado pelo autor

Ao observarmos a porcentagem de frutos com incidência de doença fúngica na região da base do pedúnculo (Figura 26 e Tabela 3), é possível notar que o número de frutos contaminados é superior aos não tratados (56%) do que nos tratados, tanto com a FO (23%) quanto com as formulações contendo o OE de orégano (ORE1%) (25.5%) e capim-limão (CL2%) (38%).

Figura 26. Lima ácida ‘Tahiti’ com crescimento fúngico na região da base do pedúnculo após 30 dias da aplicação dos tratamentos.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3. Incidência de doença fúngica na região da base do pecíolo de Limas ácidas após 30 dias da aplicação dos tratamentos

	Frutos contaminados
Não-tratado	56%
CL2%	38%
ORE1%	25,5%
F.O.	23%

CL2%: Formulação contendo OE de capim-limão à 2% (v/v). ORE1%: Formulação contendo OE de orégano à 1%

(v/v). FO: Formulação original utilizada pela empresa parceira. Porcentagem de limas ácidas ‘Tahiti’ (n = 40)

5. Discussão

Os resultados obtidos nas avaliações *in vitro* revelam a capacidade dos OEs de orégano e capim-limão de inibir a bactéria fitopatogênica *X. citri*. Ambos os óleos, quando formulados, apresentaram CBM inferiores a FO original utilizada, o que revela o potencial destes óleos como princípios ativos em uma formulação sanitizante. As propriedades antibacterianas destes óleos são relatadas pela literatura, além de outras propriedades como antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral, dentre outras. E muito deste potencial se deve aos principais constituintes dos óleos: carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) e timol (5-metil-2-(1-metiletil) fenol) no caso do óleo de orégano, e o citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal), dividido em seus isômeros geranial (*trans*-citral) e neral (*cis*-citral) no caso do óleo de capim-limão (Coccimiglio *et al.*, 2016; Kachur; Suntres, 2020; Kakarla; Ganjewala, 2015; Nostro *et al.*, 2007).

Os isômeros timol e carvacrol se diferenciam nas posições de seus grupos metil e sua hidroxila. A presença de um grupo hidroxila, associado a um sistema de elétrons desemparelhados, torna as moléculas mais hidrofílicas, o que é permite que a membrana bacteriana seja dissolvida, o que é apontado como uma possível razão para atividade antimicrobiana destes compostos (Kachur; Suntres, 2020; Ultee *et al.*, 2000; Veldhuizen *et al.*, 2006). Os resultados revelaram que aproximadamente 90% das células tratadas com OE de orégano tiveram sua membrana permeabilizada, similar ao controle térmico utilizado, efeito já observado em microrganismos de interesse médico como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Xu *et al.*, 2008), e em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Zamuner *et al.*, 2023) (**Capítulo 3**).

O citral, por sua vez, causa danos permanentes nas membranas celulares bacterianas e é possível que aumente a concentração de espécies reativas de oxigênio no interior das células, o que pode aumentar o potencial oxidativo da célula, levando a sua morte (Kang *et al.*, 2022). Nos

ensaios de permeabilidade realizados, o OE de capim-limão foi capaz de danificar a membrana celular em números próximos a totalidade das células presentes. O potencial de romper a membrana bacteriana já foi observado para outros membros do gênero *Cymbopogon*, como, por exemplo, *C. citratus*, *C. khasianus* e *C. martini*, capazes de atuar sinergicamente com moléculas antibióticas e facilitar sua ação no interior de células microbianas (Faheem *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023) (**Capítulo 4**). De maneira geral, a capacidade antibacteriana dos OEs, bem como seus princípios ativos, e seu método de ação em células bacterianas está relacionado a sua capacidade de permear a membrana celular, o que é corroborado não só pelos resultados obtidos no ensaio de microscopia, mas também pela possível ausência de uma relação de dose-reposta, nos testes *in vitro* realizados com as formulações (item 4.6), além da literatura (Pizzo *et al.*, 2023).

Em contrapartida, nenhum efeito foi observado na formação de biofilme de *X. citri*, considerado um mecanismo importante de infecção e patogenicidade. Mesmo em concentrações “sub-letais”, ou seja, inferiores as concentrações bactericidas, há redução no número de células, devido a danos causados a membrana, como revelado pelo ensaio de microscopia *Live - Dead*, mas nenhuma redução significativa na formação de biofilme.

Quanto a capacidade de reduzir a formação de lesões de cancro cítrico foi observado que o OE de orégano foi capaz de reduzir significativamente o número de lesões de cancro cítrico na superfície foliar, apontando um uso pré-colheita do OE, em oposição aos resultados obtidos pelo OE de capim-limão, que embora tenha apresentado uma redução numérica no número de lesões, a redução foi insignificante se comparado ao número de lesões no controle negativo. Ainda, os altos valores de desvio padrão observados para o OE de capim-limão, levando ao seu agrupamento estatístico com ambos os controles (CN e CP) pode estar relacionado a difícil dispersão dessas substâncias em soluções aquosas.

Embora o OE de orégano tenha apresentado resultados promissores no controle da doença em mudas de citrus, os efeitos observados nos ensaios de fitotoxicidade em sementes de alface e tomate apontam para ação tóxica dos OEs, bem como da FO. Tais resultados não divergem do relatado por outros autores e possivelmente estão relacionados às propriedades alelopáticas dos OEs. Alelopatia pode ser descrita como formas de interação intra e interespecífica entre espécies vegetais através da liberação de metabólitos secundários e outros compostos bioativos, o que torna o efeito importante de ser compreendido tanto em sistemas naturais quanto sistemas agrícolas (Aslam *et al.*, 2017; Bellache *et al.*, 2022). Tanto OEs do gênero *Origanum*, e seus compostos principais, timol e carvacrol, quanto do gênero *Cymbopogon*, já tem efeitos fitotóxicos descritos em plantas comerciais e espécies de ervas daninhas (Ibáñez; Blázquez, 2017; Poonpaiboonpipat *et al.*, 2013; Synowiec *et al.*, 2017). Ainda assim, os efeitos em sementes de alface tratadas pela FO são similares aos demais tratamentos, e ainda mais acentuados em sementes de tomate.

Os resultados apresentados no teste de fitotoxicidade apontam para um uso controlado das formulações em questão. A capacidade de inibir a germinação de sementes modelos pode indicar que os produtos elaborados, bem como a FO, podem ter efeito negativo na microbiota e em espécies vegetais se acumulados no solo. Neste contexto, a empresa parceira faz uso controlado da FO, com tratamento dos resíduos gerados durante a aplicação nas linhas de beneficiamento.

Ao observarmos os resultados do ensaio de sanitização é possível notar que as formulações com OEs de orégano (a partir de 1% v/v) e de capim-limão (2% v/v) foram capazes de reduzir o número de células recuperadas entre 3 e 4 $\log^{10}$ UFC.mL⁻¹ (Figuras 9 e 10), de maneira similar a FO. Ainda que o número de células recuperadas após os ensaios seja maior que zero, em algumas réplicas, o número de células residuais na superfície da casca podem ser consideradas como insignificantes. Segundo Behlau *et al.*(2021), suspensões de *X. citri* com concentrações entre 10⁰

e 10^2 UFC.mL⁻¹ não foram capazes de causar o desenvolvimento de novas lesões de cancro cítrico. Ademais, é esperado a redução no número de células viáveis com o tempo de estocagem, seja essa redução natural, ou devido a um efeito residual do produto utilizado (Behlau *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2014).

Em relação às propriedades físicas dos frutos, após a exposição aos tratamentos durante e durante seu armazenamento, é possível apontar diferenças entre os experimentos realizados em simulação no laboratório e teste realizado nas linhas de beneficiamento. As limas ácidas ‘Tahiti’ tratadas com a FO e a formulação contendo OE de orégano como princípio ativo não apresentaram manchas causadas pelo rompimento de glândulas de óleo na casca (oleocelose), como visto na simulação em laboratório. Ainda, a formulação utilizando OE de capim-limão como princípio ativo não apresentou nenhum efeito visual negativo nas cascas dos frutos pós-tratamentos durante todo o experimento.

Em relação à incidência de doenças fúngicas na região da base do pecíolo dos frutos, foi observada uma redução de aproximadamente 30% no número de frutos contaminados quando tratados pela F.O. ou pela formulação ORE1%, e aproximadamente 20% em frutos tratados com a formulação CL2%. É possível que os princípios ativos presentes tenham inibido ou retardado o crescimento micelial, visto que tanto o OE de orégano, quando de capim-limão, e seu gênero *Cymbopogon*, tem efeitos fungicidas e fungistáticos descritos na literatura (Kakarla; Ganjewala, 2015; Sahal *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023).

Por fim, nenhuma diferença significativa no peso ou diâmetro dos frutos foi observada ao longo de 30 dias, com quedas similares entre os frutos tratados e aqueles não tratados, o que indica que a perda de massa observada não foi intensificada pela presença das formulações. De maneira geral, a manutenção das características visuais, associada à capacidade da formulação com OE de

capim-limão e orégano de sanitizar frutos contaminados com *X. citri* aponta os OEs como um possível substituto para o princípio ativo da FO original.

6. Conclusão

As formulações contendo OE de orégano e capim-limão, em suas concentrações de 1% (v/v) e 2% (v/v), respectivamente foram eficientes em sanitizar limas ácidas ‘Tahiti’, removendo células de *X. citri* das cascas dos frutos, impossibilitando o surgimento de novas lesões. Ademais, as formulações não causaram efeitos visuais nos frutos quando comparados aos controles utilizados, bem como não reduziram o volume de massa fresca nos parâmetros avaliados.

A fim de assegurar a propriedade intelectual dos parceiros envolvidos e permitir o contínuo desenvolvimento desses produtos, foram submetidos dois pedidos de patente (abaixo), um deles (A) já foi depositado no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), e o outro (B) encontra-se em fase final de análise pela Agência UNESP de Inovação (AUIN):

(A) - Número do Processo: BR 10 2023 021354 5 - Formulação Sanitizante para frutos de limão-Taiti contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* a base do Óleo Essencial de Capim Limão (*Cymbopogon flexuosus*);

(B) - Número do Processo: BR 10 2023 024955 8 - Produto para sanitização de limões-Taiti, contaminados pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, formulado a partir do óleo essencial de Orégano (*Origanum vulgare*) como princípio ativo.

7. Referências

- Ali, E.O.M.; Shakil, N. A.; Rana, V. S.; Sarkar, D. J.; Majumder, S.; Kaushik, P.; Singh, B. B.; Kumar, J. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 108, p. 379–387, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901730448X>.
- Aslam, F.; Khaliq, A.; Matloob, A.; Tanveer, A.; Hussain, S.; Zahir, Z. A. Allelopathy in agro-ecosystems: a critical review of wheat allelopathy-concepts and implications. **Chemoecology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–24, 2017.
- Azhdarzadeh, F.; Hojjati, M.; Tahmouzi, S.; Azhdarzadeh, Fatemeh; Hojjati, Mohammad; Didehban, S. T. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pelargonium roseum* essential oil from southwest of Iran. **Journal of Food and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 47–54, 2018. Disponível em: https://jfabee.ut.ac.ir/article_69609_697f42a02f45fc5c80afa935d98b52d2.pdf.
- Battisti, M. A.; Caon, T.; Machado de Campos, A. A short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 63, p. 102283, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224720315720>.
- Behlau, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 1–12, 2021.
- Behlau, F.; Canteros, B. I.; Minsavage, G. V.; Jones, J. B.; Graham, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 12, p. 4089–4096, 2011.
- Behlau, F.; Paloschi, A.; Marin, T. G. S.; Santos, T. A.; Ferreira, H.; Nascimento, L. M. do. Chlorine dioxide, peroxyacetic acid, and calcium oxychloride for post-harvest decontamination of citrus fruit against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker. **Crop Protection**, [s. l.], v. 146, p. 105679, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219421001496>.
- Bellache, M.; Torres-Pagan, N.; Verdeguer, M.; Benfekih, L. A.; Vicente, O.; Sestras, R. E.; Sestras, A. F.; Boscaiu, M. Essential Oils of Three Aromatic Plant Species as Natural Herbicides for Environmentally Friendly Agriculture. **Sustainability**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 3596, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/6/3596>.
- Benzaid, C.; Tichati, L.; Djeribi, R.; Rouabhia, M. Evaluation of the Chemical Composition, the Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Mentha × piperita* Essential Oil against Microbial Growth and Biofilm Formation. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 335–346, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0972060X.2019.1622456>.
- Bozin, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I.; Jovin, E. Antimicrobial and Antioxidant Properties of

Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 19, p. 7879–7885, 2007. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0715323>.

Brasil. **Regras para Análise de Sementes (RAS)**. [S. l.: s. n.], 2009. 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf.

Busatta, C.; Mossi, A. J.; Rodrigues, M. R. A.; Cansian, R. L.; Oliveira, J. V. de. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 610–616, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

Caccalano, M. N.; Dilarri, G.; Zamuner, C. F. C.; Domingues, D. S.; Ferreira, H. Hexanoic acid: a new potential substitute for copper-based agrochemicals against citrus canker. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 131, n. 5, p. 2488–2499, 2021.

Cifuentes-Arenas, J. C.; De Goes, A.; De Miranda, M. P.; Beattie, G. A. C.; Lopes, S. A. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. e0190563, 2018. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190563>.

Coccimiglio, J.; Alipour, M.; Jiang, Z.-H.; Gottardo, C.; Suntres, Z. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 1–8, 2016. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/1404505/>.

Coelho, F. C.; Squitti, R.; Ventriglia, M.; Cerchiaro, G.; Daher, J. P.; Rocha, J. G.; Rongioletti, M. C. A.; Moonen, A. C. Agricultural use of copper and its link to Alzheimer's disease. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–19, 2020.

Coletta-Filho, H. D.; Takita, M. A.; Souza, A. A.; Neto, J. R.; Destefano, S. A. L.; Hartung, J. S.; Machado, M. A. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 279–285, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/100/2/279/6718421>.

Da Silva, S. R.; Bezerra, D. N. F.; Bassan, M. M.; Cantuarias-Avilés, T.; Arthur, V. Postharvest of irradiated tahiti lime fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 38, n. 4, 2016.

Da Silva, A. C. R.; Ferro, J. A.; Reinach, F. C.; Farah, C. S.; Furlan, L. R.; Quaggio, R. B.; Monteiro-Vitorello, C. B.; Sluys, M. A. Van; Almeida, N. F.; Alves, L. M. C.; Do Amaral, A. M.; Bertolini, M. C.; Camargo, L. E. A.; Camarotte, G.; Cannavan, F.; Cardozo, J.; Chamberg, F.; Ciapina, L. P.; Cicarelli, R. M. B.; Coutinho, L. L.; Cursino-Santos, J. R.; El-Dorry, H.; Faria, J. B.; Ferreira, A. J. S.; Ferreira, R. C. C.; Ferro, M. I. T.; Formighieri, E. F.; Franco, M. C.; Greggio, C. C.; Gruber, A.; Katsuyama, A. M.; Kishi, L. T.; Leite, R. P.; Lemos, E. G. M.; Lemos, M. V. F.; Locali, E. C.; Machado, M. A.; Madeira, A. M. B. N.; Martinez-Rossi, N. M.; Martins, E. C.; Meidanis, J.; Menck, C. F. M.; Miyaki, C. Y.; Moon, D. H.; Moreira, L. M.; Novo, M. T. M.; Okura, V. K.; Oliveira, M. C.; Oliveira, V. R.; Pereira, H. A.; Rossi, A.; Sena,

J. A. D.; Silva, C.; De Souza, R. F.; Spinola, L. A. F.; Takita, M. A.; Tamura, R. E.; Teixeira, E. C.; Tezza, R. I. D.; Trindade dos Santos, M.; Truffi, D.; Tsai, S. M.; White, F. F.; Setubal, J. C.; Kitajima, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, [s. l.], v. 417, n. 6887, p. 459–463, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/417459a>.

Da Silva Gündel, S.; De Souza, M. E.; Quatrin, P. M.; Klein, B.; Wagner, R.; Gündel, A.; Vaucher, R. de A.; Santos, R. C. V.; Ourique, A. F. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 118, p. 268–276, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017313475>.

De Rapper, S.; Viljoen, A.; Van Vuuren, S. The In Vitro Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Conventional Antimicrobial Agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/2752739/>.

Donkersley, P.; Silva, F. W. S.; Carvalho, C. M.; Al-Sadi, A. M.; Elliot, S. L. Biological, environmental and socioeconomic threats to citrus lime production. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 339–356, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0160-x>.

Faheem, F.; Liu, Z. W.; Rabail, R.; Haq, I. U.; Gul, M.; Bryła, M.; Roszko, M.; Kieliszek, M.; Din, A.; Aadil, R. M. Uncovering the Industrial Potentials of Lemongrass Essential Oil as a Food Preservative: A Review. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1–21, 2022.

Falleh, H.; Ben Jemaa, M.; Saada, M.; Ksouri, R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 330, n. January, p. 127268, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>.

Ference, C. M.; Gochez, A. M.; Behlau, F.; Wang, N.; Graham, J. H.; Jones, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1302–1318, 2018.

Frare, G. F.; Couto, H. T. Z.; Ciampi-Guillardi, M.; Amorim, L. The causal agent of citrus postbloom fruit drop, *Colletotrichum acutatum*, can survive on weeds. **Australasian Plant Pathology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 339–346, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-016-0419-2>.

Geraci, A.; Di Stefano, V.; Di Martino, E.; Schillaci, D.; Schicchi, R. Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 653–659, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2016.1219860>.

Gottwald, T. R.; Bassanezi, R. B.; Paulo, S. Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress. **Plant Health Progress**, [s. l.], v. 1993, n. September, p. 36, 2007.

Guandalini Cunha, B.; Duque, C.; Sampaio Caiaffa, K.; Massunari, L.; Araguê Catanoze, I.; Dos

Santos, D. M.; De Oliveira, S. H. P.; Guiotti, A. M. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 109, p. 104577, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996919304340>.

Ibáñez, M. D.; Blázquez, M. A. Herbicidal value of essential oils from oregano-like flavour species. **Food and Agricultural Immunology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1168–1180, 2017.

Insawang, S.; Pripdeevech, P.; Tanapichatsakul, C.; Khruengsai, S.; Monggoot, S.; Nakham, T.; Artrod, A.; D'Souza, P. E.; Panuwet, P. Essential Oil Compositions and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five *Lavandula stoechas* Cultivars Grown in Thailand. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 16, n. 10, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201900371>.

Isman, M. B.; Miresmailli, S.; Machial, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 197–204, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-010-9170-4>.

Isman, M. B.; Machial, C. M. Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Advances in Phytomedicine**, [s. l.], v. 3, n. C, p. 29–44, 2006.

Jacquet, F.; Jeuffroy, M. H.; Jouan, J.; Le Cadre, E.; Litrico, I.; Malausa, T.; Reboud, X.; Huyghe, C. Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. **Agronomy for Sustainable Development**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–24, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00742-8>.

Kačániová, M.; Galovičová, L.; Ivanišová, E.; Vukovic, N. L.; Štefániková, J.; Valková, V.; Borotová, P.; Žiarovská, J.; Terentjeva, M.; Felšöciová, S.; Tvrdá, E. Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Essential Oil for Its Application in Foods. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 282, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/282>.

Kachur, K.; Suntres, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 60, n. 18, p. 3042–3053, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2019.1675585>.

Kakarla, S.; Ganjewala, D. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Four Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud.) Varieties. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, [s. l.], n. APRIL 2009, p. 107–109, 2015.

Kang, S.; Li, X.; Xing, Z.; Liu, X.; Bai, X.; Yang, Y.; Guo, D.; Xia, X.; Zhang, C.; Shi, C. Antibacterial effect of citral on *Yersinia enterocolitica* and its mechanism. **Food Control**, [s. l.], v. 135, p. 108775, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713521009130>.

Liu, Y.; Heying, E.; Tanumihardjo, S. A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.],

v. 11, n. 6, p. 530–545, 2012.

Lota, M. L.; De Rocca Serra, D.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Casanova, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 796–805, 2002.

Malamud, F.; Torres, P. S.; Roeschlin, R.; Rigano, L. A.; Enrique, R.; Bonomi, H. R.; Castagnaro, A. P.; Marano, M. R.; Vojnov, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, [s. l.], v. 157, n. 3, p. 819–829, 2011.

Martínez, V.; Acosta, E.; Rojas, A.; Stein, B.; Ramallo, C. J. Estudios de sobrevivencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en frutos de limoneros y su dispersión a partir de frutos cosechados y severamente infectados. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 17–24, 2014.

Miguel, M.; Gago, C.; Antunes, M.; Lagoas, S.; Faleiro, M.; Megías, C.; Cortés-Giraldo, I.; Vioque, J.; Figueiredo, A. Antibacterial, Antioxidant, and Antiproliferative Activities of *Corymbia citriodora* and the Essential Oils of Eight Eucalyptus Species. **Medicines**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 61, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2305-6320/5/3/61>.

Naqvi, S. A. H.; Wang, J.; Malik, M. T.; Umar, U. U. D.; Ateeq-Ur-rehman; Hasnain, A.; Sohail, M. A.; Shakeel, M. T.; Nauman, M.; Hafeez-Ur-rehman; Hassan, M. Z.; Fatima, M.; Datta, R. Citrus Canker—Distribution, Taxonomy, Epidemiology, Disease Cycle, Pathogen Biology, Detection, and Management: A Critical Review and Future Research Agenda. **Agronomy**, [s. l.], v. 12, n. 5, 2022.

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**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 519–523, 2007. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46804-0>.

Oliveira, S. A. C.; Zambrana, J. R. M.; Di Iorio, F. B. R.; Pereira, C. A.; Jorge, A. O. C. The antimicrobial effects of Citrus limonum and Citrus aurantium essential oils on multi-species biofilms. **Brazilian Oral Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 22–27, 2014.

Pandey, A. K.; Kumar, P.; Singh, P.; Tripathi, N. N.; Bajpai, V. K. Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. JAN, p. 1–14, 2017.

Pecora, H. B.; Dilarri, G.; Mendes, C. R.; Corso, C. R. Bioassays and coagulation studies using *Moringa oleifera* seeds for the removal of textile dyes. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 78, n. 8, p. 1679–1692, 2018.

Pepa, T. D.; Elshafie, H. S.; Capasso, R. *et al.* (2019) Antimicrobial and phytotoxic activity of *origanum heracleoticum* and *O. Majorana* essential oils growing in cilento (Southern Italy). **Molecules** 24:1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24142576>

Pizzo, J. S.; Visentainer, J. V.; Da Silva, A. L. B. R.; Rodrigues, C. Application of essential oils as sanitizer alternatives on the postharvest washing of fresh produce. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 407, p. 135101, 2023. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814622030631>.

Poonpaiboonpipat, T.; Pangnakorn, U.; Suvunnamek, U.; Teerarak, M.; Charoenying, P.; Laosinwattana, C. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 41, p. 403–407, 2013. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669012002634>.

Prashar, A.; Hili, P.; Veness, R. G.; Evans, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 569–575, 2003. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942203002267>.

Qu, S.; Yang, K.; Chen, L.; Liu, M.; Geng, Q.; He, X.; Li, Y.; Liu, Y.; Tian, J. Cinnamaldehyde, a Promising Natural Preservative Against *Aspergillus flavus*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02895/full>.

Rangel, C.N.; Carvalho, L.C.J.; Fonseca, R.B.F.; Soares, A.G.; Jesus, E.O. Nutritional value of organic acid limes (*Citrus latifolia* T.), cv. *Tahiti*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 918–922, 2011.

Radünz, M.; Da Trindade, M. L. M.; Camargo, T. M.; Radünz, A. L.; Borges, C. D.; Gandra, E. A.; Helbig, E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 276, p. 180–186, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618317588>.

Robu, R. G.; Holobiuc, A. M.; Alexoaei, A. P.; Cojanu, V.; Miron, D. Regional Patterns of Pesticide Consumption Determinants in the European Union. **Sustainability (Switzerland)**, [s. l.], v. 15, n. 3, 2023.

Sahal, G.; Woerdenbag, H. J.; Hinrichs, W. L. J.; Visser, A.; Tepper, P. G.; Quax, W. J.; Van der Mei, H. C.; Bilkay, I. S. Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 246, p. 112188, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119320641>.

Sapbamrer, R.; Kitro, A.; Panumasvivat, J.; Assavanopakun, P. Important role of the government in reducing pesticide use and risk sustainably in Thailand: Current situation and recommendations. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2023.

Savietto, A.; Polaquini, C. R.; Kopacz, M.; Scheffers, D. J.; Marques, B. C.; Regasini, L. O.; Ferreira, H. Antibacterial activity of monoacetylated alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 200, n. 6, p. 929–937, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-018-1502-6>.

Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

Schubert, T. S.; Gottwald, T. R.; Pierce, F.; Rizvi, S. a; Graham, J. H.; Dixon, W. N.; Udglfdwlqj, K. R. I.; Jdlq, D. L. Q. O. 0Hhwqlj Wkh &Kdoohqjh Ri (Udglfdwlqj &Lwuxv &Dqnhu Lq)Orulgd³\$Jdlq. **Plant Disease**, [s. l.], v. 85, n. 4, 2001.

Sharma, A. D.; Kaur, I.; Chauhan, A. Anti-aspergillosis and anti-mucormycosis potential of essential oils from two *Cymbopogon* spp. targeting riboflavin synthesis pathway. **Phytomedicine Plus**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 100440, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2667031323000362>.

Stanojevic, L. P.; Marjanovic-Balaban, Z. R.; Kalaba, V. D.; Stanojevic, J. S.; Cvetkovic, D. J.; Cakic, M. D. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Essential Oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1557–1569, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0972060X.2017.1401963>.

Synowiec, A.; Kalembe, D.; Drozdek, E.; Bocianowski, J. Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. **Journal of Pest Science**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 407–419, 2017.

Tarakanov, R. I.; Dzhalilov, F. S. U. (2022) Using of Essential Oils and Plant Extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on Soybean. **Plants** 11:. <https://doi.org/10.3390/plants11212989>

Ultee, A.; Slump, R. A.; Steging, G.; Smid, E. J. Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 620–624, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0362028X2200103X>.

Veldhuizen, E. J. A.; Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L. M.; Zweijter, C.; Burt, S. A.; Haagsman, H. P. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 1874–1879, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf052564y>.

Wengelnik, K.; Marie, C.; Russel, M.; Bonas, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 178, n. 4, p. 1061–1069, 1996.

Wu, T. L.; Zhang, B. Q.; Luo, X. F.; Li, A. P.; Zhang, S. Y.; An, J. X.; Zhang, Z. J.; Liu, Y. Q. Antifungal efficacy of sixty essential oils and mechanism of oregano essential oil against *Rhizoctonia solani*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 191, n. PA, p. 115975, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115975>.

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**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 174–

179, 2008.

Zamuner, C. F. C.; Dilarri, G.; Bonci, L. C.; Saldanha, L. L.; Behlau, F.; Marin, T. G. S.; Sass, D. C.; Bacci, M.; Ferreira, H. A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 701–709, 2020.

Zamuner, C. F. C.; Marin, V. R.; Dilarri, G.; Hypolito, G. B.; Sass, D. C.; Ferreira, H. Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker. **Frontiers in Agronomy**, [s. l.], v. 5, n. March, p. 1–11, 2023.

Capítulo 3

Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker

“Óleo essencial de oregano e seus principais componentes, Timol e Carvacrol como alternativas para o controle do cancro cítrico”

Authors: Caio Felipe Cavicchia Zamuner [†], Vítor Rodrigues Marin [†], Guilherme Dilarri, Giovane Boerner Hypolito, Daiane Cristina Sass* and Henrique Ferreira*

[†]These authors have contributed equally to this work and share first authorship

*Correspondence: Daiane Cristina Sass; Henrique Ferreira

Artigo publicado na revista científica: Frontiers in Agronomy, Section of Disease Management, v. 5, 2023

Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1148969>

Abstract

Plant Essential Oils and their constituents are well-known for their properties as antimicrobial agents and are labeled as Generally Recognized as Safe (GRAS), prompting studies around their usage in the control of food-borne microorganisms and phytopathogens. In this study, we evaluated Oregano Essential Oil (OEO), Thymol (THY) and Carvacrol (CAR) for the control of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). In vitro antibacterial assays revealed that CAR and THY inhibit *X. citri* growth at the concentrations of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 114 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, lower than OEO (136 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Bactericidal effects were observed at 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for OEO and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for CAR and THY. Investigating potential cellular targets for the compounds showed that after 30 minutes of exposure up to 84% of the cells had their membranes disrupted, implicating the membrane as the primary target. Phytotoxicity evaluations using *Lactuca sativa* and *Solanum lycopersicum* seeds showed an acute toxic effect in all treatments above 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, except for OEO and THY in *S. lycopersicum* at lower concentrations. Regarding their protective effect on citrus leaves, CAR showed no effect when compared to the untreated control (0.39 and 0.50 lesions per cm^2 , respectively). OEO and THY were able to reduce significantly citrus canker symptoms (0.18 and 0.11 lesions per cm^2 , respectively). In addition, no toxic effects were observed on citrus leaves in all treatments. THY inhibits *X. citri* growth and the development of citrus canker lesions. These results show that THY as a viable alternative to be used in citrus canker management.

Resumo traduzido

Óleos essenciais e seus constituintes são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas e são marcados como *Generally Recognized as safe* (GRAS), o que serve de estímulo para estudos sobre seu uso no controle de patógenos que afetam alimentos e fitopatógenos em geral. Neste trabalho, nós avaliamos o Óleo essencial de Orégano (OEO), Timol (THY) e Carvacrol (CAR) quanto sua capacidade de controlar a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Testes *in vitro* revelaram que CAR e THY inibiram o crescimento de *X. citri* em concentrações de 100 ug.mL⁻¹ e 114 ug.mL⁻¹, respectivamente, valores inferiores ao de OEO (136 ug.mL⁻¹). Efeitos bactericidas foram observados a 400 ug.mL⁻¹ para o OEO e 200 ug.mL⁻¹ para CAR e THY. Ao investigar alvos em potencial dos princípios ativos do OEO foi observado que após 30 minutos de exposição até 84% das células tiveram sua membrana perturbada, implicando que a membrana plasmática bacteriana é o alvo primário destes compostos. Testes de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum* mostraram um efeito tóxico agudo em todos os tratamentos acima de 200 ug.mL⁻¹, exceto para o OEO e THY em *S. lycopersicum* em concentrações menores. Em relação a capacidade protetiva em folhas de citrus, CAR não apresentou efeito significativo quando comparada a plantas não tratadas (0,39 e 0,50 lesões por cm², respectivamente). OEO e THY foram capazes de reduzir significativamente os sintomas do cancro cítrico (0,18 e 0,11 lesões por cm², respectivamente). Ademais, nenhum efeito tóxico foi observado nas folhas em todos os tratamentos. THY inibe o crescimento de *X. citri* e o desenvolvimento de lesões do cancro cítrico. Esses resultados apontam para THY como uma alternativa viável para uso no controle do cancro cítrico.

Capítulo 4

Antibacterial activity of *Cymbopogon* species essential oils and their use in post-harvest treatment for citrus canker management.

Authors: Vítor Rodrigues Marin [†]; Caio Felipe Cavicchia Zamuner [†]; Giovane Böerner Hypolito; Juliano Henrique Ferrarezi; Natália Alleoni; Mario Nicolas Caccalano; Henrique Ferreira; Daiane Cristina Sass

[†] These authors contributed equally to this work

Abstract:

Citrus canker is a disease caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) that affects all citrus of economic importance worldwide. This disease can lead to severe losses in the quantity and quality of fruit produced, demanding a management strategy to control its damage and prevent further spread of the disease. In this context, before transporting citrus fruit for juice production or to the fresh fruit market, they need to be processed and disinfected in packinghouses. To sanitize fruit, chlorine-based products are widely used, however, concerns have been raised regarding their environmental safety due to the generation of potential carcinogenic residues, intoxication of workers by inhalation, eyes and skin irritation, and finally, corrosion damage of industrial machinery. Therefore, the use of environmentally friendly and less aggressive products is becoming of great interest to the orange industry. In light of this, natural essential oils (EOs) are excellent alternatives for the sanitization of fruits due to their recognized antimicrobial activities. Here, we tested different EOs from *Cymbopogon* species for their *in vitro* antibacterial activity, their mode of action, and their potential use as a sanitizer against *X. citri*. The EOs of *C. winterianus* and *C. martini* showed bactericidal activity against *X. citri* at 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, while *C. schoenanthus* and *C. citratus* at 312 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The major constituent of *C. citratus* EO was citral (82.6 %) while for *C. winterianus*, *C. schoenanthus* and *C. martini* was geraniol (29.5, 62.2, 68.7%, respectively), suggesting that the antibacterial activities observed can be attributed mainly to citral and geraniol. Microscopy analyses showed that the bacterial membrane was the primary target for all the EOs tested. Regarding the sanitizing potential, the EOs with higher proportions of geraniol were more effective to sanitize acid limes. Fruit artificially contaminated with *X. citri* and spray-covered with *C. schoenanthus* and *C. martini* at 5% v/v, for 2 min., showed a reduction of approximately 68% in the recovery of viable bacterial cells. Therefore, these EOs might be viable natural alternatives to be used in post-harvest disinfection of citrus fruit.

Keywords: Acid limes; Lemongrass; Fruit Sanitization; *Xanthomonas citri*

Introduction

Citrus canker, caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), is a disease that affects all economically important cultivars of citrus causing significant losses in fruit yield, as well as overall fruit quality (FERENCE et al. 2018; Naqvi et al. 2022). Infection by *X. citri* generates corky-like pustules, brownish in color, and in severe cases may lead to plant defoliation and fruit drop (Schubert et al. 2001; Behlau 2021). Considering the damaging potential, alongside its presence in almost all citrus-producing areas, citrus canker is classified as a quarentenary disease, where phytosanitary barriers are placed to prevent further spread of the bacterium (Behlau et al., 2021). Post-harvest sanitization of citrus fruit is therefore mandatory to avoid the spread of the causal agent to other areas and to enable local and international commercial trades (Behlau et al. 2021).

The most commonly used vegetable and fruit surface sanitizers worldwide are based on chlorine components such as ClO_2 , $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_3$, NaClO , and $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, which have their efficacy against microorganisms demonstrated in a number of studies (Gómez-López et al. 2009; Mathew et al. 2018). Despite being widely used as a microbicidal, chlorine effectiveness varies depending on temperature, pH, and upon binding to organic matter (suspended solids, soil, and organic debris), which reduces its availability, and requires repetitive adjustments of its concentration (Mishra et al. 2018; Zamuner et al. 2020). Because of that the residual chlorine needed to kill microbes increases potentially leading to the selection of resistant variants with extended use (Mishra et al. 2018). Moreover, chlorine aqueous solutions are generally corrosive (Sun et al. 2019) and concerns have been raised since chlorine-based compounds cause skin and respiratory irritation (Alvaro et al. 2009; Lepaus et al. 2020). Water hyperchlorination should also be considered as a problem, since it may lead to the accumulation of carcinogenic trihalomethanes

and other harmful byproducts (Richardson et al. 1999; Gil et al. 2009; Brilhante São José and Dantas Vanetti 2012). Altogether, it is becoming a consensus that post-harvest alternatives to chlorine, capable of eliminating efficiently *X. citri*, while being less damaging to the environment is a goal to be met.

Essential oils (EOs) can be considered for the development of chlorine alternatives since they exhibit low toxicity/side effects in mammals and reduced persistence in the environment (Isman et al., 2021). Moreover, they have been considered as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the FDA (Food and Drug Administration - USA). The family Poaceae is one the most explored and economically relevant plant families, which includes, among others, the genus *Cymbopogon*. Examples are the aromatic grasses, commonly referred to as lemongrasses, which exhibit a citric fragrance, and they are also known for their essential oils (EOs) (Gupta and Ganjewala 2015). the *Cymbopogon* genus comprises Around 140 species, and their EOs are widely used in the cosmetic and pharmaceutical industries due to their properties like anti-pyretic, antioxidant, anti-inflammatory, diuretic, sedative, and others (Ganjewala 2009; Avoseh et al. 2015). Besides their industrial applications, *Cymbopogon* species are also used for consumption as tea, insect repellent, and in traditional medicine (Avoseh et al. 2015). Finally, the antimicrobial potential of EOs from the *Cymbopogon* genus has been documented recently against bacteria and fungi (Mangoba and Alvindia 2023; Sharma et al. 2023).

To further explorer these antimicrobial proprieties against the phytopathogen *X. citri*, four species of the *Cymbopogons* genus, *C. winterianus* (Java type), *C. schoenanthus*, *C. martini*, and *C. citratus* were evaluated for their chemical composition, ability to inhibit bacterial growth, their mode of action and sanitization potential in citrus fruit.

Material and Methods

Bacterial strain

The bacterium *Xanthomonas citri* used was the isolate 306 (IBSBF 1594). The medium used for *X. citri* growth was NYG medium (5 g.L⁻¹ of peptone, 3 g.L⁻¹ of yeast extract, 2% v/v of glycerol, and 20 g.L⁻¹ of bacteriological agar for solid media), with growth conditions of $29 \pm 1^\circ\text{C}$, and 200 rpm agitation, when needed.

Essential Oils

The EOs from *C. winterianus* and *C. martini* were obtained from Oshadhi® (LOT: 2022-001 and 2022-001, respectively) (Colombo, Brazil), *C. schoenanthus* was obtained from WNF® (LOT: 00003/23) (São Paulo, Brazil) and *C. citratus* from ViaAroma (LOT: L560003) (Porto Alegre, Brazil). All EOs used in this work were obtained from organic certified companies and reports were provided regarding their main components.

To further characterize the EOs chemical composition, all oils were submitted to a gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and a ¹H NMR analysis. The GC-MS analysis was performed in a Shimadzu GCMS-QP2010 ULTRA (Kyoto, Japan) equipped with the capillary column Rtx-5MS ((5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane) (Restek) 30 m x 0.25mm µm film thickness). The carrier gas was helium (1mL.min⁻¹), and samples were injected with 1:10 split mode, the injector and interface temperature were 250 °C and 260°C, respectively. The initial oven temperature was 60°C with 2 min hold, followed by an increase (4°C.min⁻¹) up to 200°C and then 6°C.min⁻¹ up to 260 °C with 10 min hold. Ionization source temperature was 280°C with full scan acquisition mode (70 ev). Obtained compounds were identified using the National Institute of Standards and Technology (NIST) 11.0 Mass Spectral Library EPA/NIH. The ¹H NMR analysis

was performed with CDCl_3 used as solvent in a Bruker (Massachusetts, USA) DRX-400 instrument (400 MHz ^1H NMR).

Bacterial growth inhibition assay

The inhibitory concentrations of each EO was determined using the resazurin microtiter assay (REMA) (Silva et al. 2013). In a 96-well plate, each EO was diluted in concentrations ranging from 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in a total volume of 100 μL per well. The positive control (PC) consisted of the antibiotic Kanamycin at 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and the negative control (NC) was composed by culture medium only. The bacterium inoculum was standardized to 10^5 cells per well and plates were incubated for 16h at 29 ± 1 °C. After incubation, aliquots of each well were transferred from the microplate to a petri dish containing solid NYG medium with the help of a plate replicator, and the plate was further incubated for 48h at 29 ± 1 °C. Bacterial growth was inspected visually and allowed the determination of the Minimal bactericidal concentration (MBC). The resazurin dye (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added to each well of the microplate remaining culture to a final concentration of 0.015 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, followed by 1-hour incubation at 29 ± 1 °C. In the presence of active respiring cells, the resazurin dye (blue-colored) is reduced to resorufin, a pink, fluorescent dye allowing the quantification of metabolic active cells. The quantification of resorufin was performed in a microplate reader (Synergy H1N1, BioTek, Winooski, VT), with excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. A non-linear regression model was fitted to the inhibitions calculated to estimate the minimal inhibitory concentration necessary to prevent 90% of cell growth (IC90) (Zamuner et al. 2023).

Live-dead microscopy

The effects of the Cymbopogon EOs on the *X. citri* cell membrane were investigated using a microscopy assay described by (Zamuner et al. 2023). Each EO was evaluated at its bactericidal concentration (MBC) after 15 and 30 minutes of contact. The negative control (NC) consisted of untreated cells and the positive control (PC) consisted of *X. citri* cells submitted to thermal stress for 20 min (Saviotto et al. 2018). Followed treatments, cells were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and propidium iodide (PI). DAPI is a nucleic acid dye that penetrates all cells, while PI can only penetrate those cells with damaged membranes. After staining, cells were immobilized onto agarose-covered slides (Martins et al. 2010) and observed using a BX61 microscope (Olympus) equipped with a monochromatic Orca Flash 2.8 camera (Hamamatsu). Images were processed using the software CellSens Dimension (Olympus). To determine the number of permeabilized cells, the micrographs obtained were analyzed using the software Fiji ImageJ (Schindelin et al. 2012). Three independent experiments were conducted with 200 cells (n=200) evaluated per treatment. Statistical analysis (Brown-Forsythe and Welch ANOVA, followed by Dunnett's T3 multiple comparison test) was performed using the software GraphPad Prism v.6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Acid limes sanitization assay

Sanitization of citrus was performed as described by (Zamuner et al. 2020). Acid limes ("Tahiti" limes; *Citrus x latifolia*) purchased from an organic farmer in the Rio Claro municipality, Brazil, were selected for their size (approximately 5 cm in diameter), pre-washed with running water and then submerged in a 2% v/v sodium hypochlorite (NaClO) for 5 minutes to remove any debris and microorganisms present in the fruit surface. The fruit were left to dry at room temperature overnight. For each treatment 15 limes, subdivided into 3 replicates, were utilized and

experiments were conducted in three independent triplicates. Previously to the treatments, fruits were sprayed-covered with a *X. citri* suspension at 10^6 cells per mL (prepared in saline solution), until the run-off point; fruit were left to dry at room temperature for approximately 1h. The negative control (NC) consisted of saline buffer solution (NaCl 0,85%) and the positive control (PC) was a 5 g.L^{-1} solution of calcium oxychloride ($\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_3$) (commercial name Frexus CH, Arch Química Brasil Ltda. – Igarassu, Brazil) registered in the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA registry: No. 303880028) as a food sanitizer. Treatments were prepared in manual sprays and consisted of each EO at 3 and 5% v/v, diluted in sterilize distilled water. During the whole application process sprays were vigorously mixed to keep the mixture homogeneous and fruit kept at constant agitation in sieves. The fruit surface was exposed to the EOs for 2 min and after, limes were cold blown with a hairdryer for 30 sec to remove the excess product.

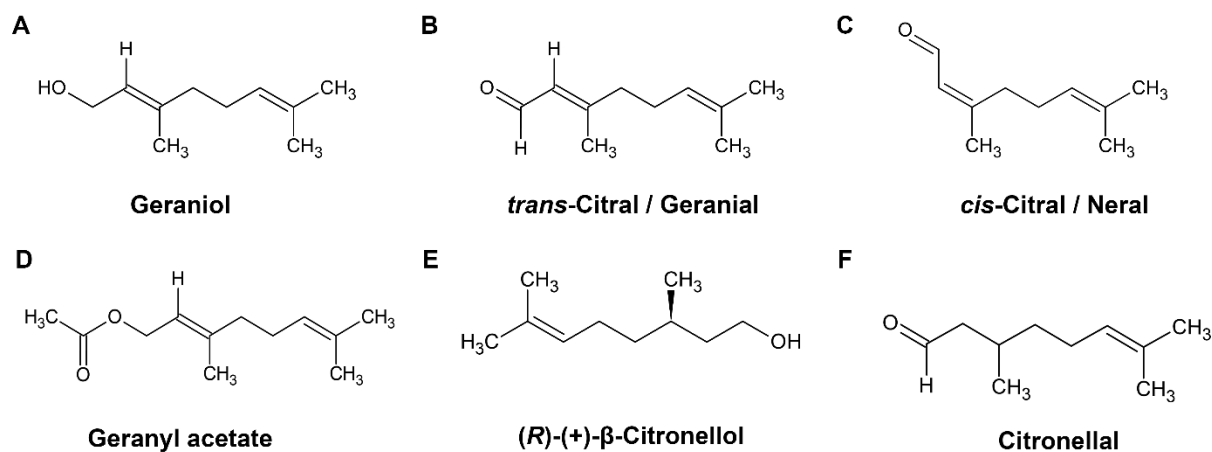
Immediately after treatments, 3 fruit were placed in plastic bags with 50 mL of sterilized phosphate buffer (PBS 1X; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4) and gently rubbed for 5 minutes to detach the cells from the fruit surface. The liquid was recovered and cells concentrated by centrifugation (20 min at 2500 xg). Cell pellet was resuspended in 1 mL of saline solution (NaCl 0.85% v/v) and serial diluted prior to spread plating in NYG medium. Plates were incubated at 29°C for 72h to allow *X. citri* growth. The statistical analysis was performed in GraphPad Prims v.6 comparing the treated groups with the NC using Kruskal-Wallis, followed by Dunn's post hoc comparison.

Results

EOs composition

GC-MS and ^1H NMR analyses were performed to elucidate the chemical composition of the EOs tested. The data obtained is shown in the Supplementary Tables and Figures 1, 2, 3 and 4. According to GC-MS and ^1H NMR analyses, the main components of the Eos were: *C. shoenhaus*: Geraniol (62%), Citral (*trans*-Citral) (9%) and Neral (synonym: *cis*-Citral) (6%); *C. winterianus*: Geraniol (29%), (*R*)-(+)- β -Citronellol (17%), Citronellal (13%) and Citral (synonym: *trans*-citral) (9%); *C. martini*: Geraniol (68%), Geranyl acetate (17%) and Citral (*trans*-Citral) (4%); *C. citratus*: Neral (*cis*-citral) (39%), Citral (*trans*-citral) (43%) and Geraniol (4%). Chemical structures of these molecules are displayed in Figure 1.

Figure 1. Chemical structures of (A) Geraniol, (B) *trans*-Citral (synonym: Geranial), (C) *cis*-Citral (synonym: Neral), (D) Geranyl acetate, (E) (*R*)-(+)- β -Citronellol and (F) Citronellal.



EOs from species of the *Cymbopogon* genus inhibit *X. citri* growth.

The ability of EOs isolated from *Cymbopogon* species to inhibit *X. citri* growth was evaluated by monitoring the metabolic activity of the cells. Dose-response curves were generated

by relating growth inhibition versus the EO concentrations and used to estimate the IC90 values for each oil (Table 1). The EO of *C. citratus* exhibited the lowest IC90 value ($139 \mu\text{g.mL}^{-1}$), followed by *C. schoenanthus* ($245 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. martini* ($298 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and *C. winterianus* ($301 \mu\text{g.mL}^{-1}$), with the last two having close numerical values and interloped confidence intervals (95% CI).

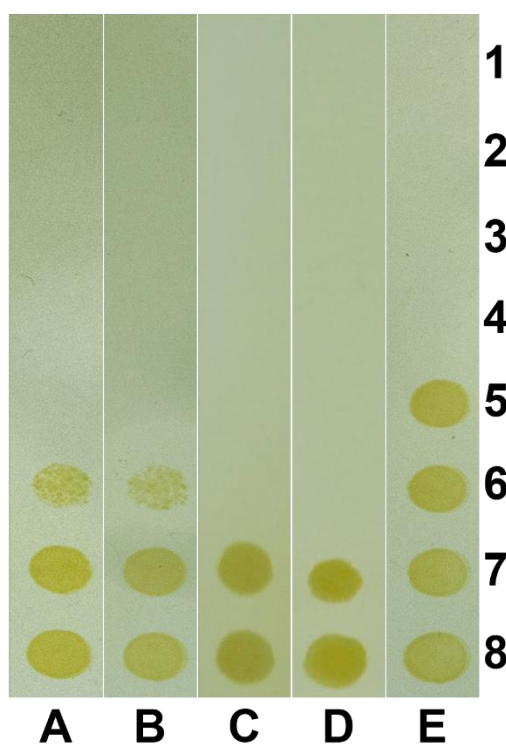
EOs from *C. citratus* and *C. schoenanthus* showed a minimal bactericidal concentration of $312 \mu\text{g.mL}^{-1}$, while *C. winterianus* and *C. martini* was $625 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Although visible bacterial growth was observed at $312 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for *C. winterianus* and *C. martini*, it was possible to notice a reduced cell density when compared to lower concentrations of the same EOs, which indicates that at $312 \mu\text{g.mL}^{-1}$ these oils exhibit a bacteriostatic activity against *X. citri* (Figure 2).

Table 1. Antibacterial concentration of EOs of *Cymbopogon* species against *X. citri*.

Essential oil	IC90 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ^a	95% CI	MBC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ^b
<i>C. winterianus</i>	301	[401, 234]	625
<i>C. martinii</i>	298	[311, 284]	625
<i>C. schoenanthus</i>	245	[268, 224]	312
<i>C. citratus</i>	139	[149, 127]	312

^a minimal inhibitory concentration for 90% of cell inhibition; ^b minimal bactericidal concentration

Figure 2. Bactericidal effects of *Cymbopogon* EOs against *X. citri*. Columns (A-F) represent the treatments, whereas (A): *C. winterianus* EO, (B): *C. martini* EO; (C): *C. schoenanthus* EO; (D): *C. citratus*; (E): Positive Control (PC), antibiotic kanamycin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Rows 1 - 4), and Negative control (NC) (Rows 5 – 8). Rows 1 – 8 represent different concentrations of the EOs: 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 and 78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively.



***Cymbopogon* EOs target the bacterial membrane.**

Bacterial cells treated at the MBC concentration (312 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *C. citratus* and *C. schoenanthus*, and 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *C. winterianus* and *C. martini*) had their cellular membranes permeabilized after 15 minutes of exposure to the Eos (Figure 3). Here, cells labeled in red were permeable to PI, which is a nucleic acid dye that can only penetrate cells with damaged membranes. All EOs tested induced membrane permeabilization with significantly higher numbers of cells permeabilized than the negative control (NC) (Figure 4).

Despite the action on membranes, no morphological changes in cells were observed in any of the treatments. The cell mean size in CN 15 min (1.745 μm , SD=0.25) and CN 30 min (1.688 μm , SD=0.23) did not diverge significantly from the other treatments: *C. schoenanthus* 15 min (1.737 μm , SD=0.47) and 30 min (1.87 μm , SD=0.47); *C. citratus* 15 min (1.985 μm , SD=0.5) and 30 min (1.722 μm , SD=0.22); *C. winterianus* 15 min (1.52 μm , SD=0.2) and 30 min (1.456 μm , SD=0.1); *C. martini* 15 min (1.494 μm , SD=0.14) and 30 min (1.382 μm , SD=0.1). Therefore, the primary cell target of the EOs was the cellular membrane.

Figure 3. Fluorescence micrographs of *X. citri* after 15 and 30 minutes of treatment. (A): Negative control (NC), untreated cells; (B): Positive control (PC), cells submitted to thermals stress for 30 min; (C - D): *C. schoenanthus* EO for 15 and 30 min, respectively; (E-F): *C. citratus* EO for 15 and 30 min, respectively; (G - H): *C. winterianus* EO for 15 and 30 min, respectively and (I - J): *C. martini* EO for 15 and 30 min, respectively. Cells artificially stained blue (DAPI) depicts cells with intact membranes, and cells with permeated membranes are artificially stained in red (PI). Scale bar: 5 μm , magnification of 100x.

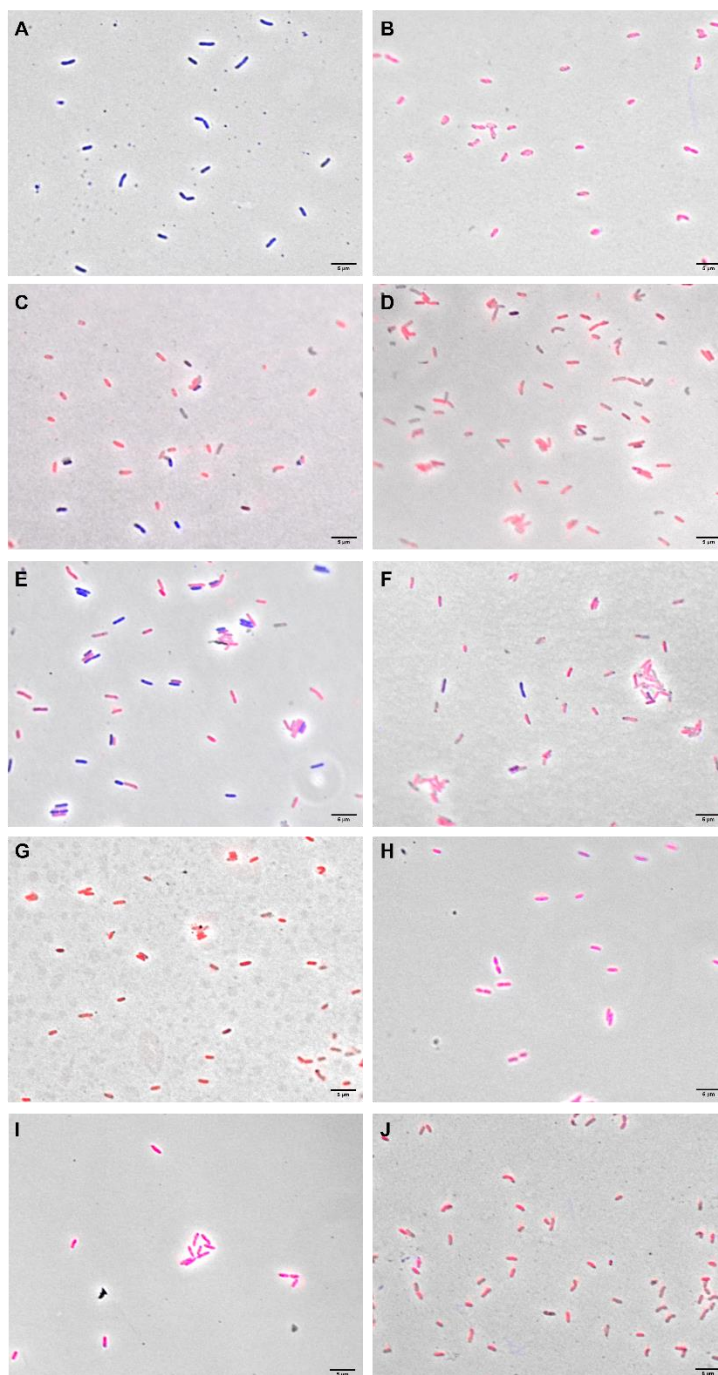
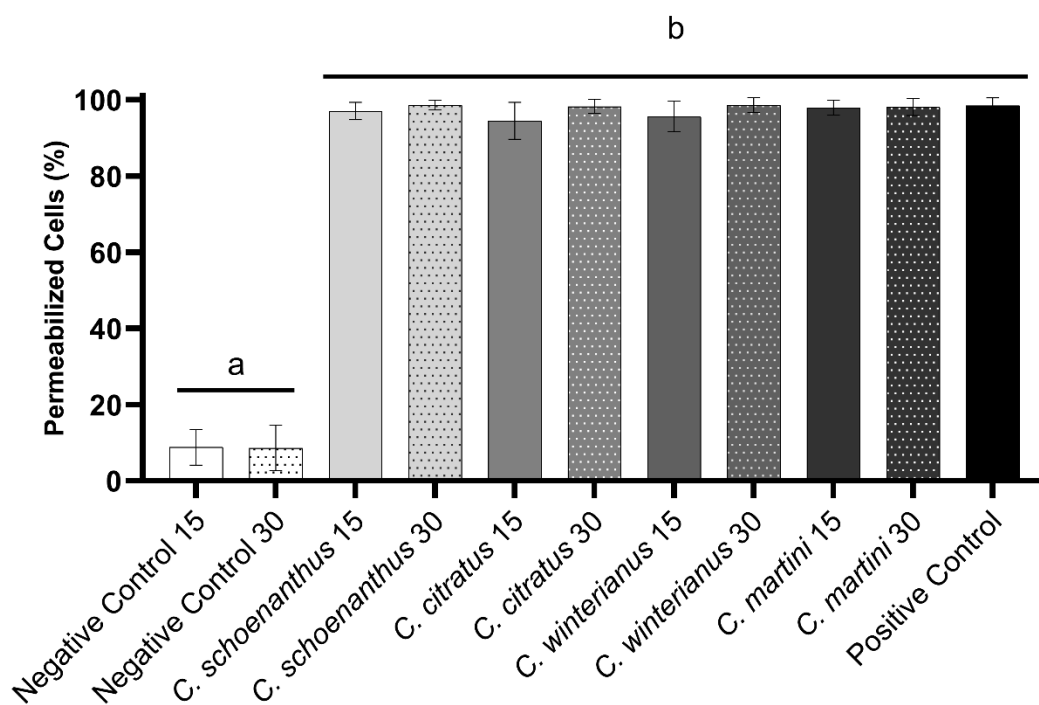


Figure 4. Percentage of *X. citri* with permeabilized cell membranes after treatments. Numbers 15 and 30 represent the duration of exposure to each treatment. (NC): Negative control, untreated cells; (PC) Positive control, cells treated with thermal stress. Bars represent the mean of each treatment and whiskers represent standard deviation. Letter a and b depicts groups statistically similar. A total of 200 cells were analyzed per treatment (n = 200).



Citrus sanitization

A sanitization assay using Tahiti acid-limes was performed under laboratory conditions to analyze the efficiency of the EOs from *Cymbopogon* species in eliminating *X. citri* cells from the fruit surface. The recovery of cells in the NC was 4.09 log₁₀.CFU/mL (SD=0.30) and significantly higher than the 1.13 log₁₀.CFU/mL (SD=0.85) recovered from fruit treated with calcium oxychloride (PC) (Figure 5) (72,37% average reduction in cell recovery in comparison with the NC).

An average reduction of 29.66%, 38.79 % and 38.94% in the recovery of *X. citri* cells in treatments with *C. citratus*, *C. winterianus* and *C. schoenanthus* EOs at 3% v/v was observed, respectively. These treatments did not show a significant effect in reducing the number of viable cells recovered after 2 minutes of exposure when compared with the NC. Still, at 3% *C. martini* EO showed slight increase in reducing cell viability (average of 44.25% log.CFU/mL) and it was significantly different from the NC (adjusted p -value < 0.02).

In treatments at the concentration of 5%, *C. citratus* EO showed an increase in activity (39.99% recovery reduction) when compared with the same oil at a lower concentration, but it was not significantly different from the NC. For *C. winterianus* at 5%, cell reduction increased to 47.72% considered significantly different from the NC (adjusted p -value < 0.003). *C. schoenanthus* and *C. martini* EOs at 5% showed a significant reduction in cell recovery (68.04% and 68.53%, respectively) (adjusted p -value < 0.0001). The PC, *C. schoenanthus* and *C. martini* treatments were effective in reducing the number of cells in fruit surface to less than 2 log.CFU/mL at the higher concentrations tested.

Figure 5. Number ($\log\text{CFU.mL}^{-1}$) of *X. citri* cells recovered from ‘Tahiti’ acid limes surface after sanitization treatments with EOs from *Cymbopogon* species. Whiskers represent min and max values. (*) represent statistically significant difference to NaCl (0.85%) treatment. A total of 9 (n = 9) replicates were analyzed per treatment.

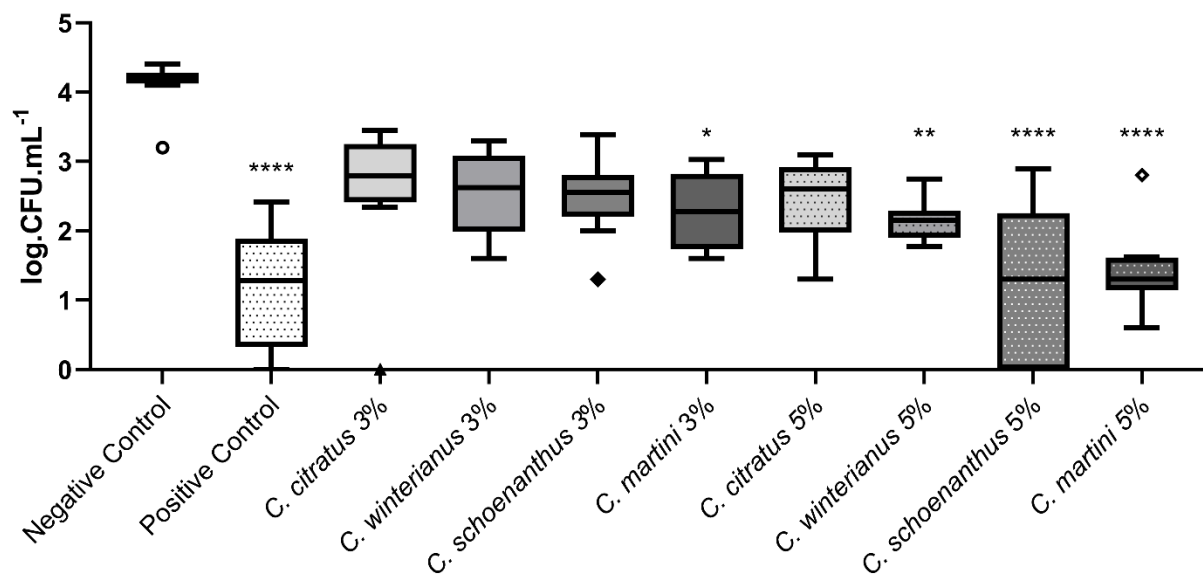
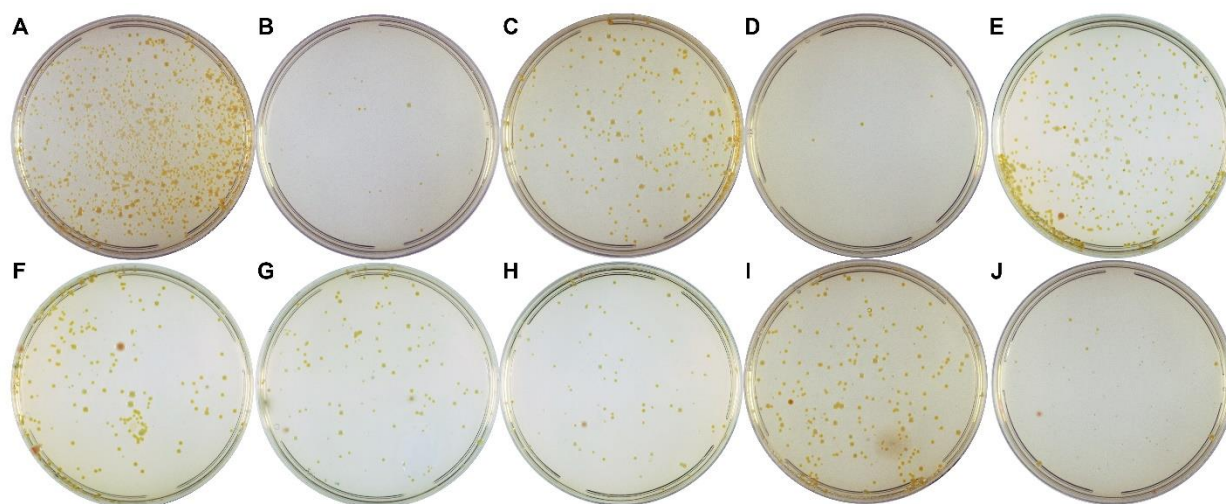


Figure 6. Representative plates of recovered *X. citri* cells recovered from ‘Tahiti’ acid limes after treatments. (A): NaCl 0.5%; (B): *Frexus* 5g.L⁻¹; (C - D): *C. schoenanthus* EO at 3% and 5% (v/v), respectively; (E-F): *C. citratus* EO for at 3% and 5% (v/v), respectively; (G - H): *C. winterianus* EO at 3% and 5% (v/v), respectively and (I - J): *C. martini* EO at 3% and 5% (v/v), respectively.



Discussion

A wide range of activities are described for EOs and their applications as antimicrobials, antioxidants, anti-inflammatories, and others, likely as a result of the great diversity in chemical composition that can vary according to genetic differences, geographical origin, extraction method, harvest season, etc. (Valková et al. 2022). EOs from *Cymbopogon* species had already been reported to be efficient against economically important phytopathogenic fungi (Lu et al. 2013), in post-harvest applications (Antonioli et al. 2020) and other *Xanthomonas* spp. (Lucas et al. 2012; Martinazzo et al. 2022; Kolozsvarine Nagy et al. 2023).

In the present work, inhibition assays *in vitro* showed that the four oils from different species of *Cymbopogon* showed activity against *X. citri*. The *C. citratus* was the oil that showed the lowest concentration both in terms of inhibiting 90% of bacterial growth ($139 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and bactericidal action ($312 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The main constituents of *C. citratus* are the two citral isomers: 42.25% of *trans*-citral (geranial) and 39.40% of *cis*-citral (neral), and in lesser quantities the *trans*-geraniol, representing 4.13% of the total oil composition.

The mixture of *cis* and *trans* isomers of citral, the two components found in greater quantities in *C. citratus* EO, has been reported in the literature to exhibit antimicrobial activity against other bacteria and fungi (Onawunmi 1989; Kolozsvarine Nagy et al. 2023). the mixture of isomers showed an inhibition starting at 0.05% v/v ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) Against *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Microsporium gypseum*. At this concentration, the mixture of isomers had no bactericidal effect on *E. coli*, different from what was observed in our study, in which the *C. citratus* showed a bactericidal effect against *X. citri* at concentrations below $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. This difference may be related to the microorganism itself or, more strongly related to other components in the EO mixture.

The study carried out by Kolozsvarine Nagy et al. 2023, exhibited the antibacterial activity of EO of *C. citratus* against two isolates of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) *in vitro*. In this work, authors showed a minimal inhibitory concentration (MIC) after 20 hours of exposure to the EO ranging from 125 to 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, whereas for the mixture of the two citral isomers the MIC ranged from 150 to 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Despite reporting only the main constituents of each EO tested, Kalozsvarine Nagy et al. (2023) results indicate that while the main component found in the EOs can be responsible for their antibacterial activity, the inhibitory properties are not exclusively related to the main component, but are also dependent on the interactions between major and minor compounds present in the mixture (Hyldgaard et al. 2012).

The other EOs *C. winterianus*, *C. maritini* and *C. schoenanthus* showed the ability to inhibit *X. citri* at higher concentrations (301, 298 and 245 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively) than that observed for *C. citratus*. For these oils, the main constituent was *trans*-geraniol, found at different proportions in each species, comprising 29.57%, 68.77% and 62.20%, respectively. These slightly different activities between these EOs may be related to the proportions of the constituents found in the oil, especially citral and geraniol, since in all these oils there is the presence of these two constituents in different proportions for each oil. Probably a synergistic action between citral and geraniol may lead to the antibacterial effect observed.

Geraniol is an aliphatic monoterpene; its structure has a functional alcohol group and a lipophilic character. These structural characteristics are attributed to its ability to adhere to cell membrane lipids of microorganisms (non-polar character) interacting with its components and disrupting the membrane (Lira et al. 2020.). Similarly, citral an acyclic monoterpenoid was reported to induce hyperpolarization and disruption of the bacterial cell membrane and decrease in intracellular ATP concentrations (Shi et al. 2016). Both reports are consistent with our findings

in microscopy assays, showing that the bacterial cell membrane is the primary target for all EOs tested and the action occurs in the first 15 minutes of exposure.

In fruit sanitization assays, we did not observe a significant effect in *X. citri* disinfection for EOs at 3% v/v. Despite showing the lowest inhibitory concentration *in vitro* *C. citratus* EO, with the highest proportion of citral, was not a good sanitizer even at the highest concentration tested. In the case of EOs that possess a higher proportion of geraniol, *C. winterianus* and *C. schoenanthus* at 3% were not effective as sanitizers. Interestingly, by increasing the concentrations of geraniol the effects were proportionally more efficient in disinfecting fruit, starting with a discreet reduction observed for *C. martini* EO (with the highest proportion of geraniol at the lowest concentration). The reduction in viable *X. citri* cells in fruit increased for *C. winterianus* EO at 5% v/v, but it was not as effective as the EOs of *C. schoenanthus* and *C. martini* at this concentration. Both were able to reduce the number of viable cells to less than 2 log.CFU.mL⁻¹, similarly to calcium hypochlorite. Although these treatments did not remove all viable cells on fruit surface, the number of remaining bacteria is not sufficient to lead to the development of canker symptoms, since it was shown that suspensions of *X. citri* at 10² cells.mL⁻¹ are not capable of inducing infection (Behlau et al. 2021). It is important to highlight that higher concentrations of EOs, in comparison with the IC90 and MBC, are needed to obtain an effective action for sanitization. The major need for an acute effect in little time of exposure and the coating of the whole fruit surface with the EOs when using water-based spray treatments, are essential factors to be considered when using EOs for sanitization. Still, the composition of each EO, once more, played an important role when applied on fruit.

As discussed previously, the major differences in the proportions of citral and geraniol (as well as other constituents) may be responsible for the variation observed in the EOs treatments in

fruit. Since citral and geraniol are different organic molecules, with the first being an aldehyde and the latter an alcohol, citral seems to be less stable than geraniol, being highly susceptible to acid-promoted and oxidative degradation (Djordjevic et al. 2008) that can hinder its effectiveness. Because of the low aqueous solubility and oxidative processes that might influence the EO action, many authors have proposed other delivery systems, such as stabilization in nano-emulsions and encapsulation using different strategies (Maswal and Dar 2014; Yegin et al. 2016; Balta et al. 2017; Antonioli et al. 2020). Nevertheless, the effectiveness of the EOs of *C. schoenanthus* and *C. martini* was demonstrated in our assays and further developments may result in a more efficient and stable formulation to improve the effectiveness and reduce the concentration needed to disinfect fruit.

Conclusion

The main component in a certain EO is attributed to be responsible to its antimicrobial activity, nevertheless synergistic effects between all the constituents, their chemical stability and availability are to be considered in the development of effective fruit sanitization products. In this work, we demonstrated that EOs from the *Cymbopogon* genus have *in vitro* antibacterial activity against *X. citri* and their main cellular target is the bacterial membrane. Furthermore, we showed the satisfactory action of the EOs of *C. schoenanthus* and *C. martini* in citrus fruit sanitization.

Supplementary Table 1. *Cymbopogon schoenanthus* essential oil composition identified through GC-MS analysis. Rt: retention time.

No.	Rt	Area (%)	Compound	Mol. weight (g.mol ⁻¹)
1	8.059	0.15	Sulcatone	126
2	8.146	0.26	β -Myrcene	136
3	10.029	0.11	<i>cis</i> - β -Ocimene	136
4	10.830	0.10	Octanol	130
5	11.845	1.08	Linalool	154
6	13.771	0.54	(R)-(+)-Citronellal	154
7	14.845	0.21	Carane	152
8	16.488	4.33	(R)-(+)- β -Citronellol	156
9	16.984	6.32	Neral (<i>cis</i> -Citral)	152
10	17.498	62.20	Geraniol (<i>trans</i> -Geraniol)	154
11	18.041	9.36	Citral (<i>trans</i> -Citral) (Geranial)	152
12	19.107	0.10	Linalyl formate	182
13	20.840	0.52	Citronellol acetate	198
14	21.087	0.30	Chavibetol	164
15	21.247	0.07	Nerol acetate	196
16	21.888	6.74	Geranyl acetate	196
17	22.058	0.10	β -Bourbonene	204
18	22.263	0.32	Cyclohexane	204
19	23.243	2.67	Caryophyllene	204
20	24.369	0.33	1,4,7,- Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl	204
21	25.264	0.20	β -copaene	204
22	25.841	0.16	α -Muurolene	204
23	26.300	0.36	3,7(11)-Eudesmadiene	204
24	26.572	0.69	δ -Amorphene	204
25	27.390	0.39	Cyclohexanemethanol	222
26	28.538	0.43	Caryophyllene oxide	220
27	-	1.96	Remaining trace compounds	-

Supplementary Table 2. *Cymbopogon citratus* essential oil composition identified through GC-MS analysis. Rt: retention time.

No.	Rt	Area (%)	Compound	Mol. weight (g.mol ⁻¹)
1	6.504	0.24	α -Pinene	136
2	7.776	0.22	β -Pinene	136
3	9.268	1.83	O-Cymene	134
4	9.408	1.78	D-Limonene	136
5	9.537	1.64	Eucalyptol	154
6	10.430	0.16	gamma-Terpinene	136
7	11.854	2.72	Linalool	154
8	13.485	0.22	3,3,5-trimethylhexa-1,4-diene	124
9	13.778	0.74	(R)-(+)-Citronellal	154
10	14.198	0.30	Verbenol	152
11	14.852	0.45	Carane	152
12	15.458	0.85	Estragole	148
13	16.235	0.23	2-Cyclopentylcyclopentanone	152
14	16.501	0.48	Citronellol	156
15	17.033	39.40	Neral (<i>cis</i> -Citral)	152
16	17.448	4.13	Geraniol (<i>trans</i> -Geraniol)	154
17	18.088	43.25	Citral (<i>trans</i> -Citral) (Geranial)	152
18	21.708	0.17	2-Isopropenyl-5-methyl-4-hexenal	152
19	21.896	1.19	Geranyl acetate	196

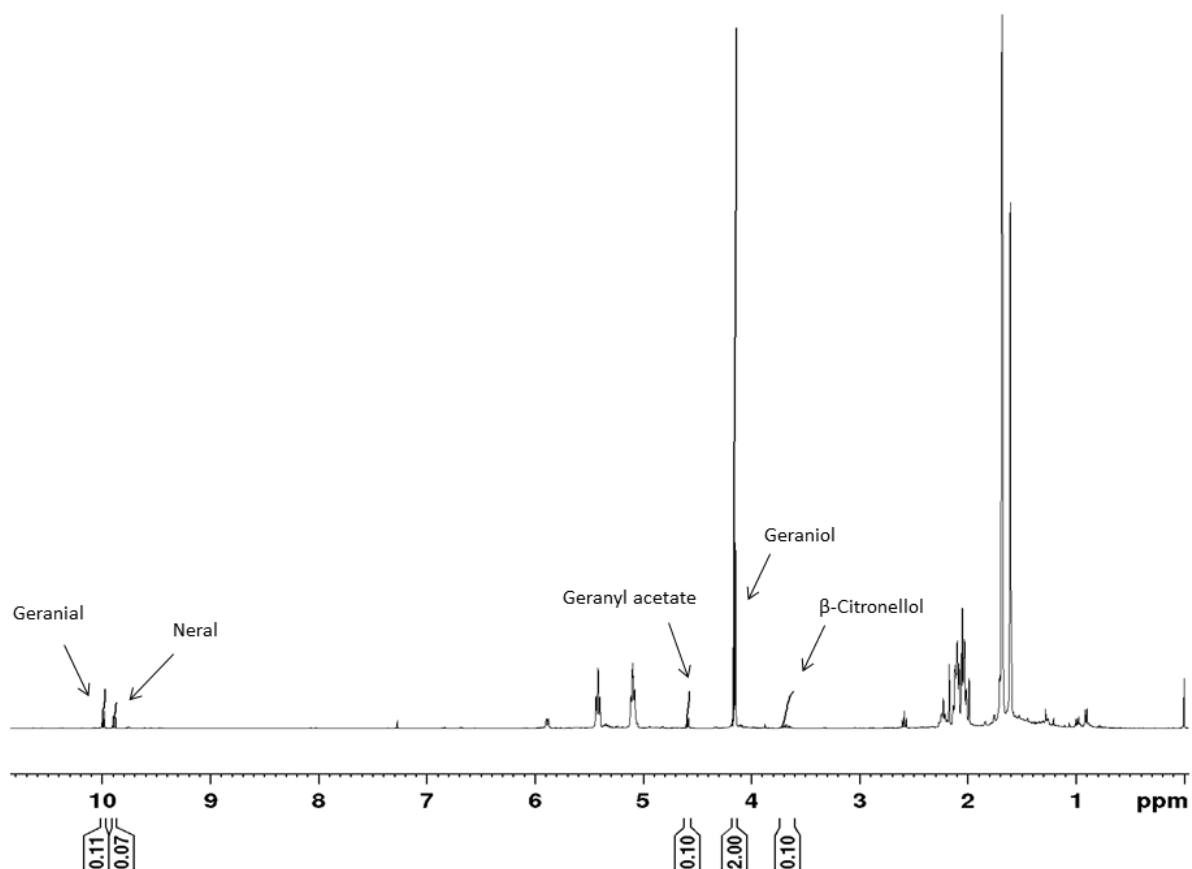
Supplementary Table 3. *Cymbopogon winterianus* essential oil composition identified through GC-MS analysis. Rt: retention time.

No.	Rt	Area (%)	Compound	Mol. weight (g.mol ⁻¹)
1	8.056	0.49	Sulcatone	126
2	8.545	0.11	Octanal	128
3	9.403	1.38	D-Limonene	136
4	9.494	0.12	(1-Methoxyethyl) cyclohexane	142
5	10.250	0.19	2,6-Dimethyl-5-heptenal	140
6	10.896	0.13	4-Nonanone	142
7	11.852	1.35	Linalool	154
8	12.288	0.13	Rose oxide	154
9	13.561	0.95	Isopulegol	154
10	13.783	13.21	Citronellal	154
11	15.663	0.44	Decanal	156
12	16.002	0.28	Undecanol-3	172
13	16.506	17.52	(R)-(+)- β -Citronellol	156
14	16.998	4.67	Neral (<i>cis</i> -Citral)	152
15	17.477	29.57	Geraniol (<i>trans</i> -Geraniol)	154
16	17.609	0.68	1-Decanol, 5,9-dimethyl-	186
17	18.050	9.53	Citral (<i>trans</i> -Citral) (Geranial)	152
18	18.157	0.68	Citronellyl formate	184
19	19.117	1.25	Geranyl formate	182
20	19.528	1.57	Citronellic acid	170
21	20.203	0.19	4-Methyl-6-hepten-3-ol	128
22	20.324	0.52	Epoxyneryl	170
23	20.855	3.47	Citronellyl acetate	198
24	21.286	0.63	1,2-Epoxyhexadecane	240
25	21.706	0.17	Menthoglycol	172
26	21.905	6.23	Geranyl acetate	196
27	22.278	0.20	(-)- <i>cis</i> - β -Elemene	204
28	23.261	0.45	Caryophyllene	204
29	24.390	0.15	Linalyl anthranilate	273
30	26.321	1.10	(+)-gamma-Cadinene	204
31	27.597	0.34	Geranyl butyrate	224
32	28.555	0.84	Caryophyllene oxide	220
33	30.647	0.13	alpha-Cadinol	222
34	38.207	0.20	Farnesol	222
35	-	1.13	Remaining trace compounds	-

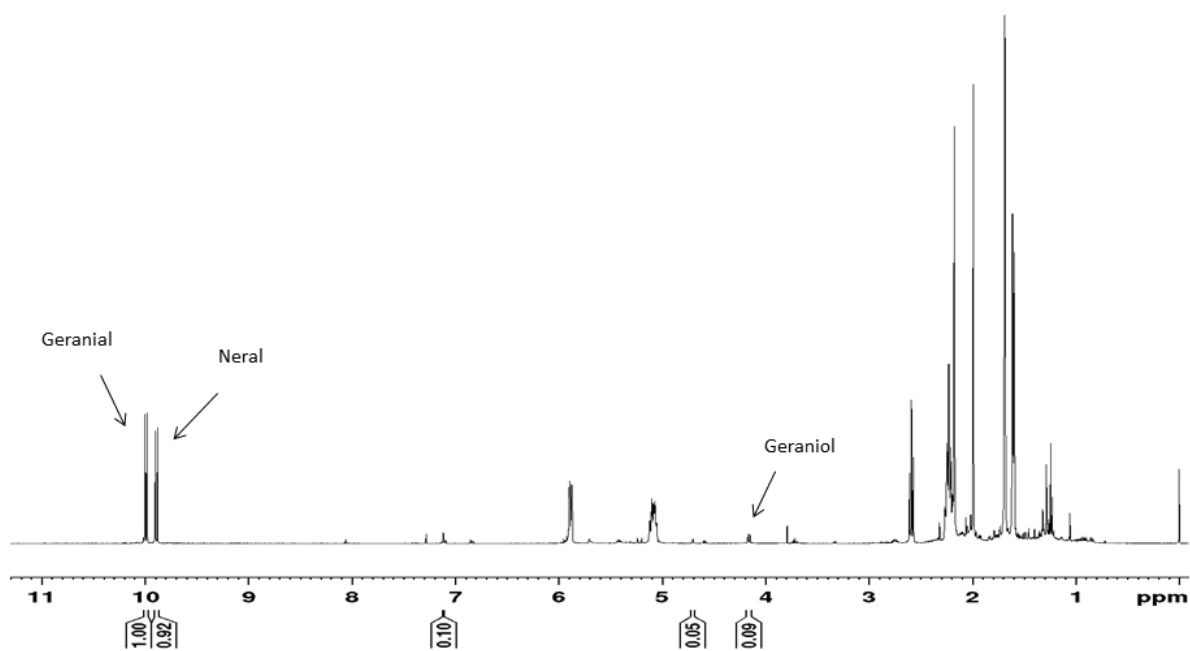
Supplementary Table 4. *Cymbopogon martini* essential oil composition identified through GC-MS analysis. Rt: retention time.

No.	Rt	Area (%)	Compound	Mol. Weight (g.mol ⁻¹)
1	4.578	0.15	<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	100
2	8.148	0.32	β -Myrcene	136
3	9.679	0.12	(E)- β -Ocimene	136
4	10.030	0.39	β -Ocimene	136
5	11.849	2.34	Linalool	154
6	16.511	0.56	Nerol (<i>cis</i> -Geraniol)	154
7	16.991	0.86	Neral (<i>cis</i> -Citral)	152
8	17.514	68.77	Geraniol (<i>trans</i> -Geraniol)	154
9	18.046	4.12	Citral (<i>trans</i> -Citral) (Geranial)	152
10	19.111	0.32	Geranyl formate	182
11	20.318	0.60	2,3-Epoxy-3,7-dimethyloct-6-enol	170
12	21.280	0.63	1,2-Epoxydodecane	184
13	21.904	17.82	Geranyl acetate	196
14	23.252	0.66	Caryophyllene	204
15	25.408	0.11	Epoxy-linalooloxide	186
16	28.544	0.54	β -Caryophyllene	220
17	32.420	0.34	<i>trans</i> -Farnesol	222
19	33.258	0.65	Geranyl butyrate	224
20	-	0.7	Remaining trace compounds	

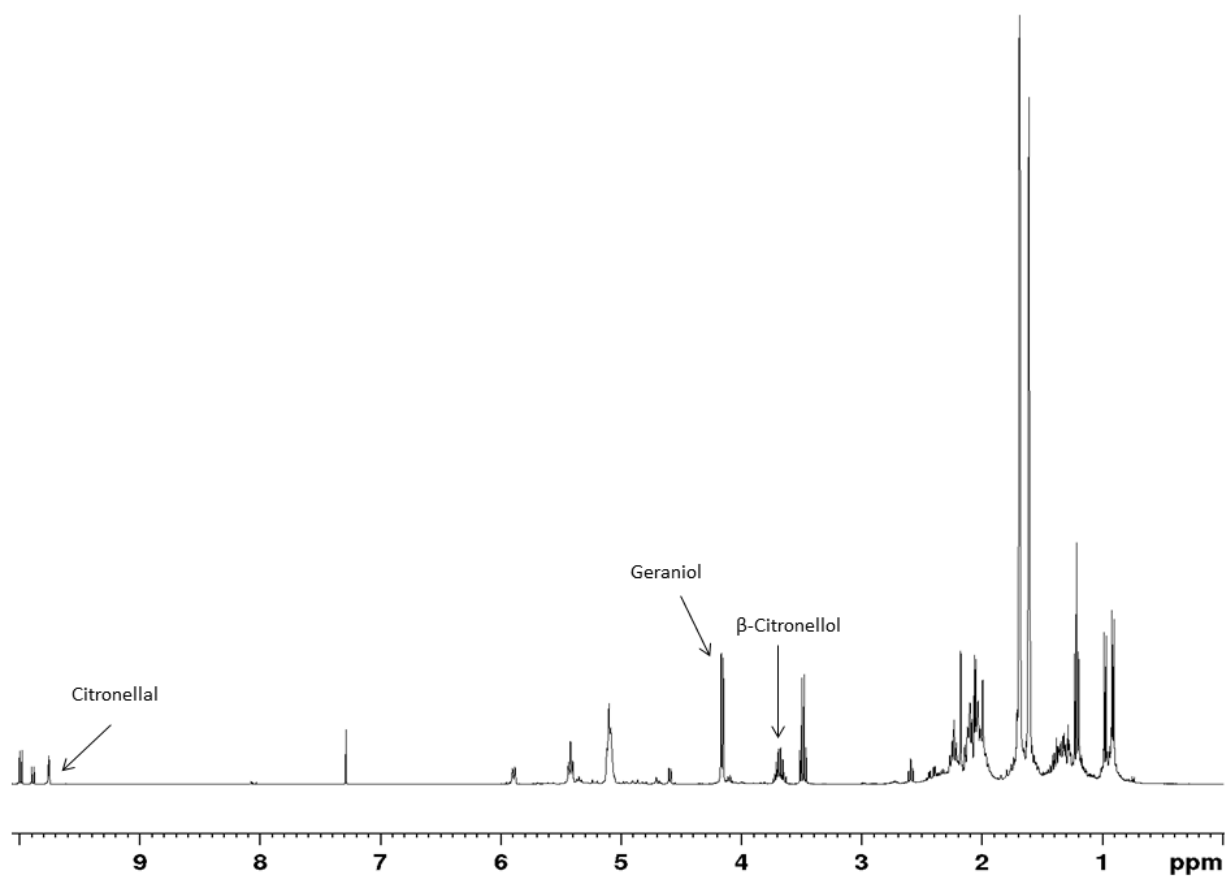
Supplementary Figure 1. ^1H NMR spectrum of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil.



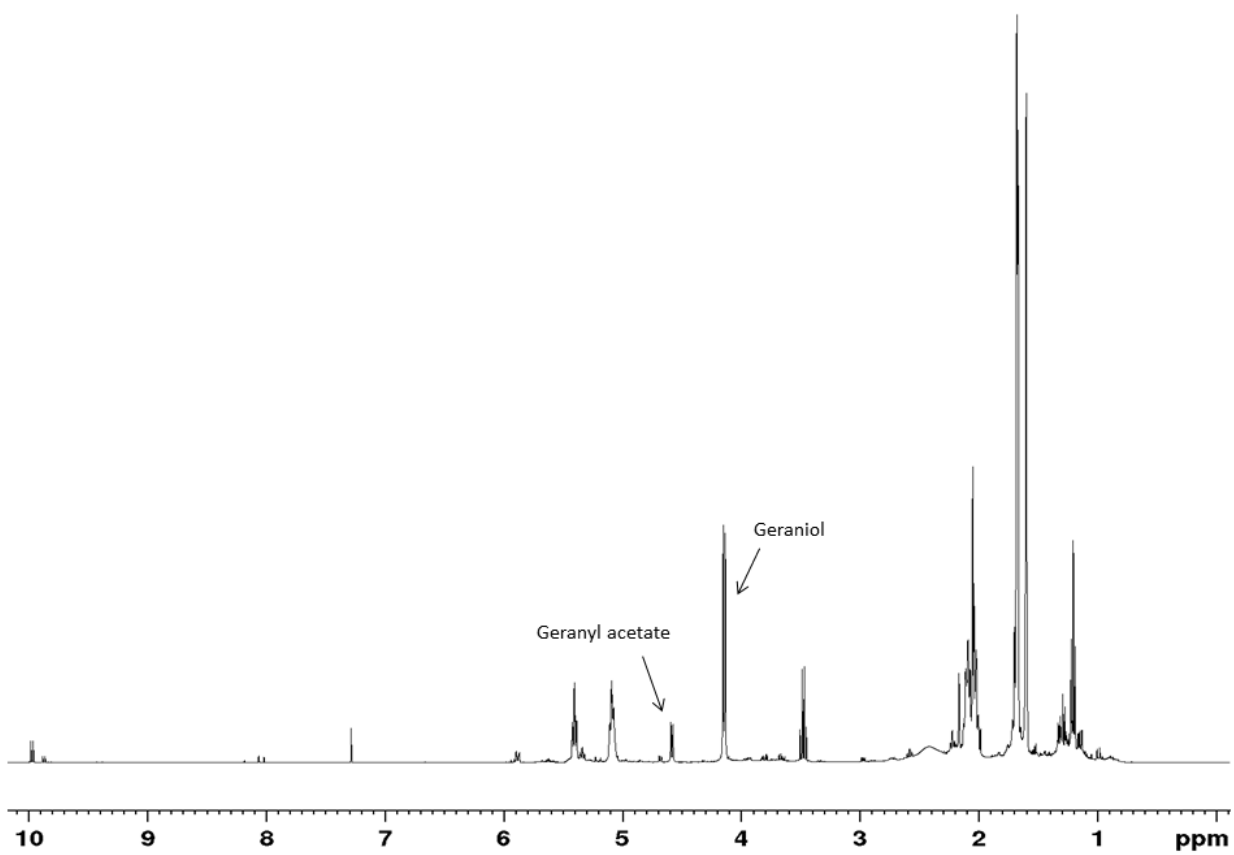
Supplementary Figure 2. ^1H NMR spectrum of *Cymbopogon citratus* essential oil.



Supplementary Figure 3. ^1H NMR spectrum of *Cymbopogon winterianus* essential oil.



Supplementary Figure 4. ^1H NMR spectrum of *Cymbopogon martini* essential oil.



References

- Alvaro, J.E., Moreno, S., Dianez, F., Santos, M., Carrasco, G. and Urrestarazu, M. (2009) Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables. *Journal of Food Engineering*, 95, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.05.003>
- Antonioli, G., Fontanella, G., Echeverrigaray, S., Longaray Delamare, A.P., Fernandes Pauletti, G. and Barcellos, T. (2020) Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chem*, 326, 126997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B. and Oyedeji, A. (2015) *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules*, 20, 7438-53. <https://doi.org/10.3390/molecules20057438>
- Balta, I., Brinzan, L., Stratakos, A.C., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L. and Corcionivoschi, N. (2017) Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 74 <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:0025>
- Behlau, F. (2021) An overview of citrus canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 46, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>
- Behlau, F., Paloschi, A., Marin, T.G.S., Santos, T.A., Ferreira, H. and Nascimento, L.M.D. (2021) Chlorine dioxide, peroxyacetic acid, and calcium oxychloride for post-harvest decontamination of citrus fruit against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker. *Crop Protection*, 146 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105679>
- Brilhante São José, J.F. and Dantas Vanetti, M.C. (2012) Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control*, 24, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.008>
- Djordjevic, D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2008) Stability of citral in protein- and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 106, 698-705. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.033>
- Ference, C.M., Gochez, A.M., Behlau, F., Wang, N., Graham, J.H. and Jones, J.B. (2018) Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Mol Plant Pathol*, 19, 1302-1318. <https://doi.org/10.1111/mpp.12638>
- Ganjewala, D. (2009) *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 56-65.

Gil, M.I., Selma, M.V., Lopez-Galvez, F. and Allende, A. (2009) Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *Int J Food Microbiol*, 134, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021>

Gómez-López, V.M., Rajkovic, A., Ragaert, P., Smigic, N. and Devlieghere, F. (2009) Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.005>

Gupta, A.K. and Ganjewala, D. (2015) Purification and Characterization of the 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase From *Cymbopogon Flexuosus* Leaves. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 8 <https://doi.org/10.5958/0974-360x.2015.00053.0>

Jacquet, F., Jeuffroy, M.H., Jouan, J., Le Cadre, E., Litrico, I., Malausa, T., Reboud, X. and Huyghe, C. (2022) Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. *Agronomy for Sustainable Development*, 42, 1-24. <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00742-8>

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

Lepaus, B.M., Rocha, J.S. and São José, J.F.B.D. (2020) Organic acids and hydrogen peroxide can replace chlorinated compounds as sanitizers on strawberries, cucumbers and rocket leaves. *Food Science and Technology*, 40, 242-249. <https://doi.org/10.1590/fst.09519>

Lira, M.H.P.D., Andrade Júnior, F.P.D., Moraes, G.F.Q., Macena, G.D.S., Pereira, F.D.O. and Lima, I.O. (2020) Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *Journal of Essential Oil Research*, 32, 187-197. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697>

Lu, M., Han, Z., Xu, Y. and Yao, L. (2013) Effects of essential oils from Chinese indigenous aromatic plants on mycelial growth and morphogenesis of three phytopathogens. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 84-92. <https://doi.org/10.1002/ffj.3132>

Lucas, G.C., Alves, E., Pereira, R.B., Perina, F.J. and Souza, R.M.D. (2012) Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 351-359.

Mangoba, M.a.A. and Alvindia, D.G. (2023) Fungicidal activities of *Cymbopogon winterianus* against anthracnose of banana caused by *Colletotrichum musae*. *Sci Rep*, 13, 6629. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33396-5>

Martinazzo, A.P., Braga, R.D.O. and Teodoro, C.E.D.S. (2022) Alternative control of phytopathogenic bacteria with essential oils of *Elionurus latiflorus* and *Cymbopogon flexuosus*. *Ciência e Natura*, 44 <https://doi.org/10.5902/2179460x67338>

Martins, P.M., Lau, I.F., Bacci, M., Belasque, J., Do Amaral, A.M., Taboga, S.R. and Ferreira, H. (2010) Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiol Lett*, 310, 76-83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02047.x>

Maswal, M. and Dar, A.A. (2014) Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. *Food Hydrocolloids*, 37, 182-195. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.035>

Mathew, E.N., Muyyarikkandy, M.S., Bedell, C. and Amalaradjou, M.A. (2018) Efficacy of Chlorine, Chlorine Dioxide, and Peroxyacetic Acid in Reducing Salmonella Contamination in Wash Water and on Mangoes Under Simulated Mango Packinghouse Washing Operations. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2 <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00018>

Mishra, V., Abrol, G.S. and Dubey, N. 2018. Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*.

Naqvi, S.a.H., Wang, J., Malik, M.T., Umar, U.U.D., Ateeq-Ur-Rehman, Hasnain, A., Sohail, M.A., Shakeel, M.T., Nauman, M., Hafeez-Ur-Rehman, Hassan, M.Z., Fatima, M. and Datta, R. (2022) Citrus Canker—Distribution, Taxonomy, Epidemiology, Disease Cycle, Pathogen Biology, Detection, and Management: A Critical Review and Future Research Agenda. *Agronomy*, 12 <https://doi.org/10.3390/agronomy12051075>

Onawunmi, G.O. (1989) Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 105-108. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00301.x>

Richardson, S.D., Thruston, A.D., Caughran, T.V., Chen, P.H., Collette, T.W., Floyd, T.L., Schenck, K.M., Lykins, B.W., Sun, G.-R. and Majetich, G. (1999) Identification of New Drinking Water Disinfection Byproducts Formed in the Presence of Bromide. *Environmental Science & Technology*, 33, 3378-3383. <https://doi.org/10.1021/es9900297>

Savietto, A., Polaquini, C.R., Kopacz, M., Scheffers, D.J., Marques, B.C., Regasini, L.O. and Ferreira, H. (2018) Antibacterial activity of monoacetylated alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Arch Microbiol*, 200, 929-937. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1502-6>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H. and Dixon, W.N. (2001) Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida-Again. *Plant Dis*, 85, 340-356. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.340>

- Sharma, N., Sheikh, Z.N., Alamri, S., Singh, B., Kesawat, M.S. and Guleria, S. (2023) Chemical Composition, Antibacterial and Combinatorial Effects of the Essential Oils from *Cymbopogon* spp. and *Mentha arvensis* with Conventional Antibiotics. *Agronomy*, 13 <https://doi.org/10.3390/agronomy13041091>
- Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., Jia, Z., Sun, H., Sun, Z. and Xia, X. (2016) Antimicrobial Activity and Possible Mechanism of Action of Citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One*, 11, e0159006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159006>
- Silva, I.C., Regasini, L.O., Petr nio, M.S., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Belasque, J., Sacramento, L.V.S. and Ferreira, H. (2013) Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology*, 195, 85-94. <https://doi.org/10.1128/JB.01442-12>
- Sun, X., Baldwin, E. and Bai, J. (2019) Applications of gaseous chlorine dioxide on postharvest handling and storage of fruits and vegetables – A review. *Food Control*, 95, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.044>
- Valková, V.,   uranov , H., Galovi ov , L., Borotov , P., Vukovic, N.L., Vukic, M. and Ka  aniov , M. (2022) *Cymbopogon citratus* Essential Oil: Its Application as an Antimicrobial Agent in Food Preservation. *Agronomy*, 12 <https://doi.org/10.3390/agronomy12010155>
- Yegin, Y., Perez-Lewis, K.L., Zhang, M., Akbulut, M. and Taylor, T.M. (2016) Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 170, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.017>
- Zamuner, C.F.C., Dilarri, G., Bonci, L.C., Saldanha, L.L., Behlau, F., Marin, T.G.S., Sass, D.C., Bacci, M. and Ferreira, H. (2020) A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. *Tropical Plant Pathology*, 45, 701-709. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00338-9>
- Zamuner, C.F.C., Marin, V.R., Dilarri, G., Hypolito, G.B., Sass, D.C. and Ferreira, H. (2023) Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker. *Frontiers in Agronomy*, 5 <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1148969>

Considerações finais

O presente trabalho discorreu sobre o uso de óleos essenciais no controle da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a causadora do cancro cítrico. Foi demonstrado que os óleos essenciais, atuando como princípios ativos de uma formulação, como demonstrado no Capítulo 2, ou sem nenhum aditivo, são capazes de reduzir efetivamente a formação de lesões de cancro cítrico em mudas de laranja (Capítulo 3), ou na sanitização de limas ácidas (Capítulo 4). Os dados apresentando no decorrer desta tese mostram também a diversidade de moléculas químicas que compõem esses óleos, bem como sua atividade antibacteriana. Por fim, é seguro afirmar os dados aqui expostos se somam a uma farta literatura (Capítulo 1), quanto a capacidade desses produtos de origem natural no controle a fitopatógenos, e que óleos essenciais são candidato viáveis para desenvolvimento de biopesticidas, aumentando a gama de produtos disponíveis para produtores e propiciando a redução de aplicação de agroquímicos convencionais, reduzindo seu efeito tóxico e cumulativo no ambiente, fortalecendo alternativas sustentáveis para uma prática menos nociva de agricultura.