



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

**Efeito da concentração de eugenol contra *Xanthomonas citri* e na
biodegradação e ecotoxicidade de biogel de quitosana**

GIOVANNA GENNARI KASA

Rio Claro – SP
2025

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EUGENOL CONTRA *XANTHOMONAS*
CITRI E NA BIODEGRADAÇÃO E ECOTOXICIDADE DE BIOGEL DE
QUITOSANA**

GIOVANNA GENNARI KASA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientador: Dr. Michel Brienzo

Coorientador: Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro – SP

2025

K19e	Kasa, Giovanna Gennari Efeito da concentração de eugenol contra <i>Xanthomonas citri</i> e na biodegradação e ecotoxicidade de biogel de quitosana / Giovanna Gennari Kasa. -- Rio Claro, 2025 71 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Michel Brienzo Coorientador: Henrique Ferreira 1. Microbiologia Aplicada. 2. <i>Xanthomonas citri</i>. 3. Quitosana. I. Título.
------	--

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeito da concentração de eugenol contra *Xanthomonas citri* e na biodegradação e ecotoxicidade de biogel de quitosana

AUTORA: GIOVANNA GENNARI KASA

ORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

COORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MICHEL BRIENZO**
Data: 15/04/2025 14:57:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO (Participação Virtual)

Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN UNESP Rio Claro

Documento assinado digitalmente
 **BEN HUR MATTIUZZO**
Data: 21/04/2025 09:15:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZZO (Participação Virtual)

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

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME DILARRI**
Data: 16/04/2025 15:01:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio Claro, 11 de abril de 2025

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que fizeram parte e colaboraram para a realização deste trabalho. Quando escolhemos ser pesquisador imergimos em um novo universo, cercado de novos desafios e aprendizagem. Gerando impacto na ciência e tecnologia do país. Sendo assim, gostaria de agradecer a Unesp e ao IPBEN que forneceram toda a infraestrutura para que eu realizasse a minha pesquisa, além de me proporcionarem um espaço seguro e acolhedor, ao meu orientador Prof. Dr. Michel Brienzo que me instruiu proporcionando amadurecimento profissional e humano, ao meu coorientador Prof. Dr. Henrique Ferreira que abriu as portas do seu laboratório e confiou em mim como cientista, auxiliando no meu rigor científico, amadurecimento e proporcionando a minha imersão em uma equipe muito bem treinada, além de acolhedora e que fez meus dias mais leves, aos meus parceiros de laboratório e hoje amigos que me ensinaram diariamente que o esforço da pós-graduação é convertido em resiliência, parceria e acima de tudo compreensão de que somos a parte de um todo admirável, a ciência, aos meus familiares, parceiros e amigos que me acompanharam nessa jornada, vocês sempre foram a base para que eu me observasse capaz de cada desafio que me proponho a realizar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O Brasil domina mais de 70% do mercado global de laranja e suco de laranja, sendo a citricultura fundamental para a economia, especialmente em São Paulo. No entanto, enfrenta desafios como o cancro cítrico, que é controlado por soluções à base de cobre para prevenir a infecção pela *Xanthomonas citri*. Este estudo avaliou o eugenol puro (SA – EU98) e em formulações (SC – EU5 e SC – EU90) como alternativa ao controle da bactéria, tanto *in vitro*, como em casa de vegetação. Filmes de quitosana e carregados com eugenol (1, 4 e 8%) foram avaliados quanto a suas propriedades físico-químicas, desintegração/biodegradação em condições de casa de vegetação. Testes *in vitro* indicaram que SC – EU5 e SA – EU98, nas concentrações de 0,5% e 1%, foram eficazes e selecionados para ensaios em casa de vegetação. O composto SC – EU5 reduziu as lesões em 7,4 vezes, SA – EU98 em 5,7 vezes, e o cobre apresentou a maior redução, em 9,2 vezes. Em casa de vegetação, com umidade relativa do ar variando de 31,48% a 98,71%, e temperatura de 15,48 C° a 43,88 C°, a desintegração dos filmes levou cerca de 60 dias, sendo que nem todos os filmes foram totalmente biodegradados. Além disso, foi possível registrar diferenças entre os grupos contendo quitosana e quitosana carregada com eugenol em relação a espessura e solubilidade. Já nos dados de absorbância, TGA e DSC, foi possível observar uma tendência na mudança do comportamento dos dados conforme o aumento da concentração de eugenol. A análise da biodegradação e da atividade enzimática indicou que concentrações de 1% e 4% (m.m⁻¹) de eugenol estimularam a atividade da β -glicosidase, enzima associada à degradação do carbono orgânico, enquanto concentrações superiores não apresentaram efeitos significativos. Já a atividade da arilsulfatase, responsável pela captação de sulfato, demonstrou uma tendência de redução conforme o aumento da concentração de eugenol, entretanto testes complementares com outros valores de eugenol devam ser realizados. Os resultados indicam que a formulação SC – EU5 aumenta significativamente a eficácia do eugenol puro e reforçam seu potencial como alternativa ao controle do cancro cítrico, sendo uma alternativa ambientalmente mais amigável ao comparar-se ao cobre.

Palavras-chave: Cancro cítrico; Citricultura; Bioplástico; Compostos ativos; Fitotoxicidade; Biodegradação, β -Glicosidase, Arilsulfatase.

ABSTRACT

Brazil dominates over 70% of the global orange and orange juice market, with citrus farming being a key sector for the economy, especially in São Paulo. However, the industry faces challenges such as citrus canker, which is typically controlled using copper-based solutions to prevent infection by *Xanthomonas citri*. This study evaluated pure eugenol (SA – EU98) and its formulations (SC – EU5 and SC – EU90) as alternative means of controlling the bacterium, both in vitro and in greenhouse conditions. Chitosan-based films, loaded with eugenol (1%, 4%, and 8%), were assessed for their physicochemical properties and degradation/biodegradation under greenhouse conditions. In vitro tests showed that SC – EU5 and SA – EU98, at concentrations of 0.5% and 1%, were effective and selected for greenhouse trials. The SC – EU5 formulation reduced lesions by a factor of 7.4, SA – EU98 by 5.7, while copper demonstrated the highest reduction, at 9.2-fold. Under greenhouse conditions—with relative humidity ranging from 31.48% to 98.71% and temperature from 15.48 °C to 43.88 °C—the films took approximately 60 days to degrade, though not all films were completely biodegraded. Additionally, differences were observed between chitosan-only films and those containing chitosan and eugenol in terms of thickness and solubility. Absorbance data, TGA, and DSC analyses revealed trends indicating changes in behavior as eugenol concentration increased. Biodegradation and enzymatic activity analysis showed that 1% and 4% (w/w) eugenol concentrations stimulated β -glucosidase activity, an enzyme associated with organic carbon degradation, while higher concentrations had no significant effect. Arylsulfatase activity, responsible for sulfate acquisition, tended to decrease as eugenol concentration increased, although further tests with additional concentrations should be conducted. The results indicate that the SC – EU5 formulation significantly enhances the efficacy of pure eugenol and reinforces its potential as an environmentally friendly alternative to copper in the control of citrus canker.

Keywords: Citrus canker; Citriculture; Bioplastic; Active compounds; Phytotoxicity; Biodegradation; β -Glucosidase; Arylsulfatase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Citricultura e o cancro cítrico	10
2.2. Compostos bioativos como alternativas ao cobre.....	11
2.3. Quitosana.....	12
2.4. Biodegradação e ecotoxicidade.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Eugenol e formulação de eugenol	16
4.2. Formação de biogel de quitosana	17
4.3. Caracterização do biogel.....	17
4.3.1. Espessura	17
4.3.2. Opacidade.....	18
4.3.3. Solubilidade em água.....	18
4.3.4. Umidade do bioplástico	18
4.3.5. Análise Differential Scanning Calorimetry (DSC)	19
4.6. Diversidade microbiana.....	20
4.8. Avaliação da ecotoxicidade em sementes.....	23
4.9. Linhagem e cultivo microbiano	24
4.10. Inibição do crescimento bacteriano	24
4.11. Teste protetivo em casa de vegetação	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Análises Físico-químicas do composto (SA – EU98).....	27
5.1.1 Solubilidade do filme de quitosana e quitosana carregada com eugenol.....	28
5.1.3. Umidade do biofilme de quitosana e quitosana carregada com eugenol	30
5.1.4. Análise Differential Scanning Calorimetry (DSC) de quitosana e quitosana carregada com eugenol	31
5.1.5. Absorbância UV-Vis do biofilme de quitosana e quitosana carregada	34
5.2 Inibição do crescimento bacteriano por eugenol e fórmula de eugenol.....	35
5.4. Atividade microbiana em solo após biodegradação de filme de quitosana e quitosana carregada com eugenol	44
5.5. Avaliação da ecotoxicidade em sementes.....	48
5.6. Inibição do crescimento bacteriano	55
5.7. Potencial protetivo do eugenol e formulação em casa de vegetação	56

6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS	59
8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	71

1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

De acordo com o relatório mais recente do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA,2024), na safra 2023/24, o Brasil manteve sua posição de destaque na produção global de laranjas e suco de laranja. O país foi responsável por aproximadamente 30% da produção mundial de laranjas e por cerca de 65% do volume global de suco de laranja, dominando mais de 70% do mercado internacional de suco de laranja. A liderança contínua do Brasil nesse setor é atribuída a fatores como condições climáticas favoráveis, técnicas avançadas de cultivo e uma indústria de processamento bem desenvolvida.

Além da importância no comércio externo, o setor citrícola possui uma grande geração de empregos. Segundo o Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged), a indústria citrícola é o setor agrícola que mais emprega no estado de São Paulo, com uma taxa de um empregado para cada nove hectares cultivados. Para comparativo, o setor da cana possui taxa de um empregado para cada 80 hectares cultivados (CAGED, 2018). Embora o domínio brasileiro em citricultura, o setor ainda sofre com problemas como o cancro cítrico, que é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). O Cancro cítrico não tem cura e o seu combate dá-se por meio da aplicação de soluções a base de cobre, que visa impedir a infecção e disseminação da bactéria (FUNDECITRUS, 2018).

Atualmente o cobre mostra-se eficaz no contexto de controle do cancro cítrico, entretanto, existem diversas evidências de que sua aplicação resulte em efeitos negativos ao meio ambiente (BEHLAU et al., 2017). Visto que o acúmulo de cobre pode ocasionar mudanças na anatomia, morfologia e fisiologia de diversas espécies vegetais ocasionando danos às raízes, diminuição da absorção de nutrientes e água, além da redução da taxa fotossintética (Ambrosini et al., 2015; Bochicchio et al., 2015). Desta forma, para reduzir o uso massivo de cobre nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido diversos compostos ativos capazes de combater *X. citri* (DILARRI, 2021).

Uma alternativa consiste no composto bioativo eugenol (objeto do presente estudo). Segundo a literatura, apresenta caráter promissor no controle bactericida, além de ser um composto natural extraído a partir do óleo de cravo e que utiliza processos menos danosos ao meio ambiente. Por ser uma alternativa em potencial, o eugenol encontra-se presente em diversos estudos já realizados, inclusive propostos

pelo presente grupo de pesquisa e por outros pesquisadores (ZAMUNER *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2023; DA CRUZ SILVA *et al.*, 2021; LIS *et al.*, 2017; SAKKAS *et al.*, 2017; UMA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017).

Considerando-se os efeitos bactericidas do eugenol e sabendo-se que os hidrogéis constituem redes poliméricas tridimensionais que adquirem água quando colocados em contato com a mesma, mas que não perdem sua base estrutural neste processo (DOMALIK-PYZIK *et al.*, 2019). Há, portanto, um interesse crescente nos hidrogéis em decorrência de sua biocompatibilidade, elaboração facilitada, além de diversas aplicações como, por exemplo sua associação ao eugenol.

Os hidrogéis têm sido amplamente aplicados em diversas áreas como, por exemplo, na administração de nutrientes, medicamentos, engenharia de tecidos e outras diversas no cenário econômico mundial (QASIM *et al.*, 2018). Este fator deve-se as suas diversificadas utilidades e em particular aquelas desenvolvidas a partir de polissacarídeos como a quitosana, a pectina, o alginato de sódio e o amido (QASIM *et al.*, 2018).

Desta forma, a quitosana, utilizada no presente estudo, pode ser obtida por meio da desacetilação da quitina que consiste em um popular biomaterial polissacarídico sendo composto a partir de β -(1–4)-2-acetamido-2-desoxi- β -d-glucopiranosose e de 2-amino-2-desoxi- β -d-glicopiranosose com valor de pKa variando de 6,3 a 6,5 (CHOI *et al.*, 2016). Além disso, a quitosana possui carga superficial positiva dos grupos amino da glucosamina (monômero da quitosana) em pH < 6,3, permitindo, portanto, uma maior interação com as membranas celulares microbianas carregadas negativamente (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016).

Na presente proposta, foi avaliada formulações industriais a base de eugenol, determinando as concentrações bacteriostáticas/bactericidas, o efeito protetivo em casa de vegetação e seu efeito de fitotoxicidade em sementes de alface e tomate. Além disso, o presente projeto de pesquisa visou avaliar como o eugenol em diferentes concentrações no biogel de quitosana atuou no processo de biodegradação em solo (condições de casa de vegetação), bem como o seu impacto na atividade microbiológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura e o cancro cítrico

O cultivo ou plantação de citros com fins comerciais caracteriza-se como citricultura. Os citros são plantas do gênero *Citrus*, originários do sudeste tropical e subtropical da Ásia, sendo pertencentes à família Rutaceae (DUARTE et al., 2016a). O grupo é composto por um total de três espécies (*Citrus reticulata*, *Citrus medica* e *Citrus maxima*) juntamente com vários híbridos naturais e cultivados. Os frutos dos *Citrus* podem ser a cidra, laranja, lima, limão, tangerina e a toranja. Estes, por sua vez, são ricos em compostos bioativos e vitamina C, sendo uma ótima fonte de alimento e vitaminas essenciais para o corpo humano (DUARTE et al., 2016b).

Por ser considerado um produto básico global não industrializado com preço uniformemente determinado pela oferta e procura internacional, a citricultura é considerada uma “commodity”. Sendo, portanto, uma das atividades agrícolas mais lucrativas do mundo. De acordo com o último levantamento, feito pela Organização das Nações Unidas, para a Alimentação e a Agricultura (FAOSTAT), no ano de 2019 os três maiores produtores de citros do mundo consistiram na China, Brasil e Índia, respectivamente (FAOSTAT, 2019).

Apesar do sucesso notável, a citricultura brasileira enfrenta constantemente problemas relativos às pragas e doenças que acarretam redução da produção, perda de frutos ou até mesmo das plantas. Dentre as doenças que acometem os citros as que mais merecem destaque são: leprose cítrica causada pelo *Citrus Leprosis Virus* (CiLV) (REHMAN et al., 2020), pinta preta que possui como agente etiológico o fungo *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*) (SCHREUDER et al., 2018), *Candidatus Liberibacter asiaticus* causadora do Greening/Huanglongbing (HLB) (LI et al., 2020) e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) responsável pelo cancro cítrico (BEHLAU, 2021).

Das doenças supracitadas, o cancro cítrico é uma das mais importantes para a citricultura, devido ao fato de causar perdas e uma redução significativa na produção dos pomares (ZHANG et al., 2010; FERENCÉ et al., 2018). Além disso, o cancro cítrico causa a limitação de compra e venda por conta das barreiras sanitárias que

são necessárias serem implementadas, segundo a instrução normativa nº 21, de 25 de abril de 2018 da União.

A bactéria Gram-negativa *X. citri* infecta todas as variedades de importância comercial de citros, sendo essa bactéria classificada como uma praga quarentenária, ou seja, aquelas que têm impacto econômico em potencial para as áreas em que não se estejam presentes ainda, ou, quando instaladas, estejam pouco distribuídas e sob controle oficial segundo as Normas Internacionais Para Medidas Fitossanitárias (NIMF Nº 5, 2019) (GOTTWALD et al., 2002; ZHANG et al., 2010; GE et al., 2015; BATTAGIN et al., 2021).

Uma vez que a planta é infectada pelo cancro cítrico ocorre o aparecimento das lesões no tecido vegetal, caracterizando-se em grande parte das vezes com lesões corticosas, circulares, salientes, com coloração castanho amarelado e aspecto eruptivo (BITTANCOURT, 1957; GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989; ROSSETTI, 1993; MORÃO, 2018). A infecção e surgimento da lesão ocorre nas partes aéreas da planta como folhas, ramos e frutos, gerando consequentemente desfolhamento da mesma, diminuindo assim a produção de seus frutos (GOTTWALD et al., 2002; ZHANG et al., 2010; ZHANG & MENG, 2011; BEHLAU 2021).

O controle do cancro cítrico é realizado por aplicação de técnicas de manejo integrado que incluem o plantio de mudas livres de cancro cítrico, a utilização de cultivares de citros menos suscetíveis à doença, uso de quebra-ventos, sendo que estes agem reduzindo a propagação das *X. citri* pelas gotículas da chuva carregadas pelo vento, o controle da larva minadora de citros e a aplicação de bactericidas à base de cobre (Normativa 21 / MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicado em 25 de abril de 2018).

2.2. Compostos bioativos como alternativas ao cobre

Alternativas já foram propostas no combate e controle do cancro cítrico, visando uma agricultura mais sustentável e diminuindo consequentemente a aplicação de cobre no campo. Dentre elas, recentemente, tem-se destacado cada vez mais a utilização de compostos naturais ou derivados de moléculas de origem natural para o desenvolvimento de agentes bioativos com atividade bactericida (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ et al., 2021; JOSHI et al., 2021; NG et al.,

2021), na sanitização de alimentos (BATTAGIN et al., 2021) ou contra fitopatógenos (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; CAVALCA et al., 2020; CACCALANO et al., 2021).

Esses agentes bioativos têm a vantagem de apresentar características bactericidas, menor impacto ambiental ao comparar-se ao cobre e mecanismos de ação mais específicos para as células procarióticas (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; POLAQUINI et al., 2019; MORÃO et al., 2019). Os óleos essenciais são um exemplo de compostos bioativos aromáticos voláteis de origem vegetal que apresentam atividade inibitória frente a diversos microrganismos conhecidos (CALO et al., 2015).

Segundo Battagin et al. (2021), os pesquisadores descreveram em seu estudo a atividade bactericida do óleo essencial de cravo frente as células de *X. citri*, obtendo sucesso na sanitização de limões contaminados com este fitopatógeno. Além dos óleos essenciais, moléculas bioativas de origem vegetal como o cinamaldeído, também já foram relatados como capazes de proporcionar inibição de células de *X. citri* (ZAMUNER et al., 2020).

2.3. Quitosana

A quitosana possui diversas atividades, ao voltar-se ao contexto de cultivo de plantas, pode realizar papéis como induzir a resistência a doenças em plantas, promover o crescimento e desenvolvimento das mesmas, além de melhorar a qualidade e o rendimento dos produtos vegetais. Diversos autores (He et al., 2018; Mesa et al., 2015 e Berger et al., 2011) corroboram com as informações supracitadas, visto que, relatou-se, segundo He et al., (2018) que o tratamento de morangos com 50 ppm de quitosana antes da colheita resultou em melhor qualidade do produto, conforme indicado pelo aumento dos teores de viscosidade, lignina, açúcar, proteína, sólidos solúveis totais e acidez titulável dos frutos de morango.

De modo geral, segundo Mesa et al., (2015) a quitosana pode ser utilizada como um regulador de crescimento vegetal no campo agrícola para aumentar a resistência a doenças, promover o crescimento e melhorar a qualidade da fruta. No contexto em que o foco é a germinação de sementes, a quitosana tem sido estudada tanto *in vitro* como em campo, atuando como bioestimulante, e quando usada como revestimento das sementes proporciona proteção as plantas, apresenta resultados

positivos na taxa de germinação, assim como, em parâmetros de crescimento, gerando maior rendimento as culturas (Mesa et al., 2015).

Em estudos realizados por Van et al. (2017) foram verificados efeitos de diferentes aplicações da quitosana para o aumento de rendimento em plantas de soja. De acordo com os autores, a aplicação foliar de oligo-quitosana e oligo-quitosana nano-sílica demonstrou que o rendimento de sementes de soja aumentou 10,5% e 17% para oligo-quitosana e oligo-quitosana nano-sílica respectivamente.

A quitosana apresenta-se como um controle de microrganismos fitopatogênicos durante a pré e pós-colheita permitindo-se plantas mais resistentes, além de proporcionar a liberação controlada de fertilizantes e agroquímicos, no favorecimento da produção vegetal, na fixação biológica de nitrogênio e atribuindo uma vida útil mais longa aos alimentos revestidos (BERGER et al., 2011).

Segundo Maluin e Hussein, (2017) observou-se o efeito da quitosana na proteção de plantas de tomate contra *Fusarium oxysporum f.sp lycopersicii*, visto que, no tratamento controle sem a aplicação da quitosana, as plantas ficaram mais susceptíveis ao patógeno. Isto decorre da possibilidade de a quitosana atuar como fungicida contra várias doenças como, por exemplo, *Fusarium oxysporum* e giberela no grão-de-bico e no trigo, brusone no arroz, podridão do colmo e mancha foliar no milho (MALUIN E HUSSEIN, 2017)

Além disso, estudos demonstram a versatilidade da quitosana no contexto de encapsulamento e carregadora de diversos compostos, sendo sua aplicação encontrada em estudos da área alimentar, farmacêutica e agroindustrial (Kwiecień & Kwiecień, 2018 ; Rodriguez & Hemar, 2020). Essa versatilidade proporcionada pela quitosana, deve-se ao fato de que algumas de suas interações são responsáveis pelas propriedades de absorção de fluidos dos hidrogéis e incluem as forças capilares, interações moleculares e osmose (Huang, Wang, Chu & Xia, 2020).

Em hidrogéis à base de polissacarídeos, que é o caso do biogel de quitosana, estruturas de rede formam-se quando os polissacarídeos se reticulam para formar regiões de junção química ou fisicamente reticuladas e que possibilita a retenção de compostos, possibilitando a quitosana ser carregadora de compostos de interesse (Esposito, Kirilov & Roullin, 2018 ; Rehman et al., 2019 ; Zeng et al., 2021).

2.4. Biodegradação e ecotoxicidade

O emprego de quitosana e compostos bioativos na lavoura de laranja levanta uma preocupação sobre a biodegradação do gel. Visto que, a aplicação do gel pode atingir o solo juntamente com compostos ativos. Dessa maneira, torna-se fundamental conhecer o tempo de biodegradação do gel e do gel carregado com outros compostos, para que assim seja possível avaliar algum efeito de ecotoxicidade dos mesmos.

A quitosana é um polímero que pode ser degradado por enzimas de diferentes origens. As enzimas hidrolases, amplamente distribuídas na natureza, são responsáveis pela degradação enzimática da quitosana (AGUANELL et al., 2022). Uma dessas enzimas hidrolases é a lisozima, que está presente em abundância no corpo humano. Alguns microrganismos sintetizam a quitosanase degradando a quitosana, sendo que estas são encontradas em vários microrganismos, incluindo fungos e bactérias, e que foram classificadas em seis famílias de glicosídeo hidrolase (GH): GH5, 7, 8, 46, 75 e r80 (CHENG et al., 2006; ZHU et al., 2012; SAITO et al., 1999). Esses microrganismos são encontrados no solo, onde sua abundância é alta e podem participar ativamente da degradação da quitosana. De acordo com Oberlintner et al. (2021), o filme de quitosana é biodegradado em um período de cerca de 10 dias.

Os extratos de plantas possuem uma grande quantidade de bioatividades como, por exemplo, ação anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena. No entanto, ainda existem problemas físico-químicos e farmacocinéticos dos fitoquímicos, como baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade, baixa capacidade de penetrar nas células e consumo rápido por tecidos normais. Além disso, a taxa de depuração rápida e a meia-vida de eliminação curta dos compostos naturais também são relatadas (RIZWANULLAH et al., 2018). A incorporação dos fitoquímicos extraídos de plantas naturais em um sistema de entrega como hidrogéis, especialmente o hidrogel de quitosana, abordaria essas desvantagens e seria um avanço no aumento dos efeitos terapêuticos dos compostos promissores.

A germinação de sementes tem como característica uma sequência de eventos fisiológicos (GARCIA, 2006), influenciada principalmente pela água, que por meio de sua absorção a respiração e demais atividades metabólicas da semente são intensificadas. Assim, se a água estiver contaminada, todo o processo germinativo

poderá ser ameaçado (GARCIA, 2006). Isso faz com que o grau de germinação de certas espécies sensíveis na presença de contaminantes potencialmente tóxicos possa ser utilizado como um indicador da toxicidade. *Lactuca sativa* é uma espécie bastante empregada em ensaios de germinação, por ser facilmente obtida e por oferecer resultados rápidos e fáceis de serem avaliados (GARCIA, 2006). Nestes testes, pode ser avaliada a inibição da germinação e também a inibição do crescimento da radícula e do epicótilo.

3. OBJETIVOS

O presente estudo visou avaliar eugenol e eugenol em formulação industrial contra *Xanthomonas citri*. O efeito da quitosana carregada com e sem eugenol foram avaliados na biodegradação em solo, além do efeito na comunidade microbiana.

3.1. Objetivos específicos

Avaliar a concentração de eugenol para efeito bactericida e bacteriostático;

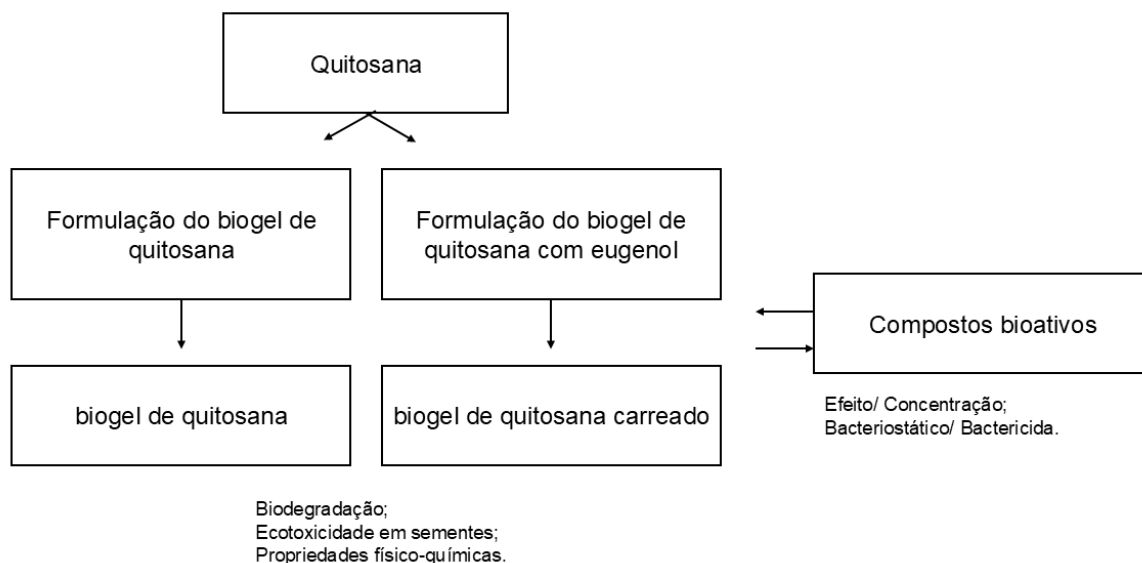
Avaliar a contribuição do eugenol na biodegradação (em condições de casa de vegetação) e nas propriedades físico-químicas do biogel;

Avaliar a biodegradação de biogel de quitosana e quitosana carregada com compostos bioativos;

Avaliar a atividade microbiana após o processo de biodegradação de biogel de quitosana e quitosana carregada com compostos bioativos;

Avaliar uma possível ecotoxicidade do eugenol em sementes.

Figura 1: Fluxograma de experimentos do presente projeto avaliando o efeito dos compostos bioativos na biodegradação e ecotoxicidade



Fonte: autora

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Eugenol e formulação de eugenol

O eugenol foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (denominado como AS – EU98), o produto possui $\geq 98\%$ de pureza (lote: 1003558771; validade: 22/05/27). A formulação de eugenol que foi produzida pela empresa Sta. Clara Agrociência (Ribeirão Preto - SP) utilizou o mesmo eugenol base para as formulações, visto que o grupo de pesquisa forneceu o eugenol para a produção dos mesmos. Foram produzidas pela empresa, portanto, duas formulações com eugenol, a primeira contendo 5% de eugenol em sua composição (SC-EU5) e a segunda contendo 90% de eugenol em sua composição (SC-EU90).

Além disso, a empresa também forneceu ao grupo de pesquisa os veículos utilizados para a elaboração do produto. Salienta-se que a formulação é protegida por segredo industrial, portanto, o único detalhamento cedido foi que o valor percentual em volume do veículo presente dentro da formulação não ultrapassa 0,025%. Desta forma, na presente pesquisa, optou-se em trabalhar com a mistura dos veículos $0,0125\%V1 + 0,0125\%V2 = (VMIX) \leq 0,025\%$.

4.2. Formação de biogel de quitosana

Para determinar a concentração inicial da solução de quitosana, foram colocadas em béqueres alíquotas de 1 g de quitosana para 100 mL de ácido acético 2%. Após a junção de soluções, as mesmas permaneceram em Shaker em temperatura ambiente por 5 horas em agitação de 800 rpm. O procedimento foi realizado em triplicata. Sendo assim, a quitosana foi diluída na concentração de 2% a serem utilizadas neste estudo 1 g/100 mL em ácido acético 2% (ácido acético e água, m.m⁻¹), tendo como base os testes dos parâmetros anteriormente realizados por Rinaudo (2006); Abreu et al., (2013) e também pelos pesquisadores do grupo.

Para a formação dos biogéis/bioplásticos associados ao composto ativo foi utilizado: a quitosana e o composto ativo eugenol, com diferentes concentrações de composto ativo, em proporção referente à massa de solutos, sendo os valores de 1%, 4% e 8%. A porcentagem de eugenol foi extrapolada considerando a concentração para efeito bacteriostático.

A secagem dos biogéis foi baseada na técnica de Casting, em que se adicionou 1,67 g desta solução por cm² de área da placa de teflon (12cmx12cm), a qual foi seca a 25 °C durante 24 h, resultando na formação de bioplástico/biogel (FAKHOURI, et al., 2007; SILVA, 2011). A obtenção do biogel na forma de filme foi escolhida para poder acompanhar a sua desintegração em solo, e determinar as propriedades físico-químicas. De forma qualitativa, o biogel foi avaliado em relação a sua continuidade, presença de bolhas e sua distribuição pela placa, e propriedades físico-químicas.

4.3. Caracterização do biogel

O biogel foi caracterizado quanto a suas propriedades físico-químicas com objetivo de determinar possíveis modificações provocadas pela adição de eugenol. Em trabalhos futuros, o gel de quitosana carregado com eugenol poderá ser utilizado em ensaios de casa de vegetação.

4.3.1. Espessura

Para a determinação da espessura, utilizou-se um micrômetro digital (Mitutoyo®) com precisão de 0,001 mm e o valor final consistiu na média aritmética de cinco medidas aleatórias em diferentes partes dos bioplásticos sendo as médias

analisadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Graphpad (FAKHOURI, et al., 2007).

4.3.2. Opacidade

A opacidade dos bioplásticos foi determinada em espectrofotômetro. As amostras estudadas foram cortadas em retângulos (1 x 0,5 cm) e aderidos à parede interna de cubeta de vidro. A leitura foi realizada em triplicada pelo espectrofotômetro global analyzer com um comprimento de onda de 200-800 nm (Lade et al., 2023). A partir dos valores de absorbância, foi calculada a opacidade como sendo uma relação entre a absorbância e a espessura do bioplástico.

4.3.3. Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes compostos de quitosana com e sem eugenol foi determinada segundo Martelli-Tosi et al., (2018) com adaptações. Todos os tratamentos foram secos em estufa a 105°C até peso constante, sendo os filmes cortados em medidas de 2 cm². Em sequência, os mesmos foram imersos em 50 mL de água destilada a 25°C por 24 h em agitação de 100 rpm. Após o este processo, os filmes foram retirados da água destilada e secos novamente em estufa a 105°C até peso constante. A solubilidade do filme foi calculada usando a equação:

$$Solubilidade (\%) = \left[\frac{M_i - M_f}{M_i} \right] \times 100\%$$

Em que M_i é a massa inicial dos corpos de prova e M_f a massa final após imersão em água destilada.

4.3.4. Umidade do bioplástico

Foram cortadas amostras de 4 cm², em sequência pesadas e inseridas em estufa a 105 °C durante 24 h. Após secas, as amostras foram pesadas novamente visando sua determinação percentual de umidade (SILVA, 2011).

4.3.5. Análise Differential Scanning Calorimetry (DSC)

As análises avaliaram a estabilidade térmica bioplástico que foi elaborado no presente estudo permitindo-se compreender sua adaptação quando exposto ao ambiente em que foi testado. Desta forma, os testes foram realizados em um DSC da marca PerkinElmer modelo 8500 com um acessório de resfriamento do tipo Intracooler II. Amostras com massa entre 5 e 7 mg foram colocadas em porta amostras de alumínio hermeticamente fechados e analisados a uma faixa de temperatura de 20°C a 250°C em uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob uma atmosfera de nitrogênio de 20 mL/min.

4.4. Biodegradação dos filmes (em condições de casa de vegetação)

O ensaio foi realizado em triplicata em vasos contendo 200g de substrato Calterra – Uemura (Composição: turfa, terra preta, humus de minhoca e composto orgânico) e acomodado em estufa com fertirrigação automatizada com adubo mineral misto (Amazon AgroSciences Citrus 100) em volume de aproximadamente 200 mL por vaso/dia. A temperatura e a umidade foram monitoradas ao longo dos dias por meio de um termo-higrômetro digital HOB0 MX2305. Desta forma, amostras de dimensões 3 × 3 cm² foram dispostas sob a superfície do solo acompanhando-se a desintegração, portanto, a biodegradação visual do biogel de quitosana, biogel de quitosana carregado com o composto bioativo testado previamente *in vitro*, foi registrado por meio de fotos.

4.5. Teste de resazurina

Para avaliar a presença de atividade metabólica dos microrganismos presentes no solo buscou-se na literatura trabalhos que utilizassem a medição da fluorescência da conversão de resazurina em resorufina visando contabilizar a respiração celular então presentes na atividade microbiana do solo após a biodegradação dos bioplásticos de quitosana com e sem carregamento de eugenol. Diversos trabalhos encontrados na literatura utilizaram métodos similares, porém voltados para outro contexto como o caso de Strotmann et al., (1991) que utilizou para a contabilização da atividade respiratória presente no esgoto coletado para monitorar a toxicidade presente no mesmo. Dessa forma, decidiu-se por elaborar uma nova metodologia, visando-se a contabilização da respiração celular em microrganismos presentes no

solo e assim, consequentemente medindo-se a taxa estimando-se um aumento ou diminuição da comunidade microbiana.

Sendo assim para a realização do presente teste utilizou-se vasos com solo de jardim para o processo de biodegradação dos bioplásticos com eugenol em triplicata, sendo os tratamentos C – terra; Q – terra + quitosana 1%; Terra + Q + 1; Q + 4 e Q + 8 – Quitosana 1% + Eugenol 1%, 4% e 8% m.m⁻¹, respectivamente. Em sequência, após o processo de biodegradação separou-se 5g de terra de cada tratamento em misturou-se 10 mL de solução salina (0,85%). Estes por sua vez permaneceram em agitação *overnight* (16 – 18 h; 28 °C – 29 °C).

Após esse processo, os tubos contendo a solução foram colocados em centrífuga (5 min a 10000X) e sequencialmente 500 uL do sobrenadante de cada tratamento em triplicata foi coletado e adicionou-se 100 uL de solução de resazurina (1 mg de resazurina + 10 mL de água destilada) e 400 uL de meio NA. A solução final foi incubada em agitação por 1 hora a 29 °C. As amostras foram lidas há cada 1 hora, em que a redução da resazurina ao composto fluorescente resorufina, que ocorre na presença de células vivas/com respiração ativa, foi quantificada em um leitor de placas fluorescentes Synergy H1N (BioTek, Winooski, VT) ajustado para excitação em 530 nm e emissão em 590 nm. Com a finalidade de mensurar o aumento ou a diminuição da comunidade microbiana por meio de respiração ativa após o processo de biodegradação dos bioplásticos.

4.6. Diversidade microbiana

Para a quantificação da microbiota alvo do solo após o contato com os bioplásticos contendo quitosana e quitosana carregada, testes de isolamento em meios de cultura seletivos específicos para cada grupo de microrganismos de interesse foram realizados. Amostras de solo foram coletadas da superfície de vasos compostos de terra, quitosana, quitosana carregada, em que se preparou uma solução contendo 5 g de amostra de solo foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 10 mL de salina estéril e misturado completamente usando um misturador de vórtice. Após esse processo, uma cultura estoque foi elaborada contendo 1 mL da solução em 9 mL de salina estéril a partir da solução inicial. Sendo então diluída em série para uma concentração de 10⁻⁴ (Pei et al., 2021; Borges et al., 2023 adaptado).

Para o isolamento de fungos utilizou-se o método *spread-plate* em ágar dextrose de batata (PDA). Desta forma, 100 uL de amostra do tubo de ensaio diluído em série 10^{-1} a 10^{-4} foi espalhado uniformemente utilizando alça de Drigalski estéril sobre a superfície das placas, sendo realizadas em triplicata. As placas foram alocadas em incubadora B.O.D com fotoperíodo de 12 horas a 27 °C por até 7 dias e observadas (Pei et al., 2021; Borges et al., 2023 adaptado). Para isolamento bacteriano foram realizadas as mesmas atividades de solução estoque e diluição seriada, diferenciando-se no processo de crescimento em placa, visto que foram realizadas 5 gotas de 10 uL por diluição na placa de petri e o meio de crescimento foi o Ágar Nutriente (NA). As placas de crescimento bacteriano também foram colocadas em incubadora B.O.D com fotoperíodo de 12 h a 27 °C por até 7 dias e observadas. A quantificação das comunidades microbianas foi realizada pelo método de contagem em placas fornecendo a quantificação de células microbianas viáveis (TORTORA; CASO; FUNKE, 2016). Sendo os valores encontrados convertidos para unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC.g⁻¹).

4.7. Atividade enzimática

Para avaliar a possibilidade da ação enzimática presente a partir dos microrganismos presentes no solo após a biodegradação bioplásticos de quitosana, quitosana com eugenol e o controle contendo somente solo foram testados a partir da montagem da reação das respectivas enzimas selecionadas mediante a pesquisa prévia, sendo elas a Arilsulfatase e β -glucosidase.

4.7.1. β -glicosidase e Arilsufatase

A atividade enzimática da β -glucosidase relaciona-se a reações necessárias para que a microbiota do solo seja capaz de realizar como a decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica e estruturação do solo, fatores essenciais para a saúde do solo e desta forma, constituindo-se um indicador sensível para a avaliação da qualidade do solo (Ramos et al., 2020; Rodrigues et al., 2022).

A Arilsulfatase, entretanto, consiste em uma enzima que catalisa a hidrólise do éster de sulfato orgânico (Kertesz e Mirleau, 2004) e é tipicamente disseminada nos solos (Tabatabai e Bremner, 1970; Gupta et al., 1993; Ganeshamurthy et al., 1995).

Possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de p-nitrofenil sulfato, fenil sulfato de potássio, nitrocatecol sulfato de potássio e fenolftaleína sulfato de potássio (Alef e Nannipieri, 1995).

Sendo assim, em ambas as análises enzimáticas realizou-se o experimento seguindo o protocolo descrito por Tabatabai, (1994), mantendo-se as mesmas proporções de reações, entretanto, adaptou-se o experimento para volumes de 1 mL, uma vez que, buscou-se diminuir os custos de reações e de materiais.

4.7.2. Cálculo para enzimas do solo

A Atividade enzimática consiste na mensuração da capacidade de uma enzima em uma conversão de substrato em produto (Devlin et al., 2008). De acordo com a União Internacional de Bioquímica, a atividade enzimática (Unidade Enzimática ou U) é a quantidade de enzima necessária para converter 1 μmol de substrato por minuto a 30 °C (NC-IUB, 1979).

$$\text{UL}^{-1} = \frac{(\Delta A)(Vt)(Df)(10^6)}{(t)(\epsilon)(d)(Vs)}$$

Sendo:

UL^{-1} - Atividade enzimática ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$);

ΔA - Absorbância final - absorbância inicial;

Vt - Volume total da reação (mL);

t - Tempo de reação (min);

ϵ - Coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ou $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

d - Caminho óptico (1 cm);

Vs - Volume da amostra (mL);

Df - Fator de diluição;

10^6 - fator de correção ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$).

A equação foi utilizada segundo os autores Engvall, 1980; Kaplan et al., 1998 e Stewart e Ebel, 2000.

4.8. Avaliação da ecotoxicidade em sementes

Com objetivo de caracterizar a ação e dos óleos essenciais (OEs) selecionados, um ensaio de germinação de sementes foi elaborado para avaliar sua atividade fitotóxica, para tal, foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) (ISLA[®] lote: 169035-007) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (ISLA[®] lote: 170560-011). O ensaio seguiu 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, ambos previamente esterilizados, em quatro placas, totalizando 60 sementes por tratamento. 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. As formulações utilizadas foram avaliadas com concentrações variadas dos OEs, sendo 1% (AS – EU98) e 0,5% SC – EU5 (v/v). Como controle positivo utilizou-se uma solução de sulfato de zinco (ZnSO_4) a 0,02 M, e como controle negativo utilizou-se somente água destilada. Para garantir que qualquer efeito observado fosse relacionado a presença dos OEs avaliados, um controle de veículo foi adicionado ao teste, sem os princípios ativos (OEs). As placas foram então fechadas com plástico filme e levadas a incubadora a 25°C com 12 h de fotoperíodo, por cinco (alface) e sete (tomate) dias.

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 alongação radicular relativa (ER%) e índice de germinação (GI%), 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 sementes; valores abaixo de 80 indicam efeitos tóxicos relacionados a presença dos compostos avaliados.

4.9. Linhagem e cultivo microbiano

As linhagens de *X. citri* utilizadas nos experimentos foram FDC102 (Ragupathy et al., 2023). Os cultivos foram realizados em meio NYG (5 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de glicerol) a 29 ± 1 °C, sob agitação constante de 200 rpm, quando necessário.

4.10. Inibição do crescimento bacteriano

A inibição do crescimento de *X. citri* por eugenol e das formulações e seus respectivos veículos foram determinadas por meio do ensaio de microtitulação de resazurina (REMA), descrito por (Silva et al., 2013). Soluções foram diluídas serialmente em meio NYG em microplaca de 96 poços com concentrações variando de 2% a 0,0156% (v/v) em um volume total de 100 µL por poço. O controle negativo

(NC) foi composto por meio NYG apenas, enquanto o controle positivo (PC) foi composto por NYG adicionado de 50 µg/mL de Canamicina (antibiótico). O inóculo bacteriano foi adicionado a uma concentração final de 10^5 células por poço e as placas foram incubadas durante 16 horas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após o período de incubação, alíquotas de cada poço foram transferidas com um replicador de microplacas para uma placa de Petri com meio NYG sólido. A placa foi incubada por 96 horas a 29°C . Após o período de incubação, as placas foram inspecionadas visualmente para detectar qualquer crescimento bacteriano e a concentração bactericida foi determinada como sendo a concentração mais baixa em que nenhum crescimento bacteriano foi visível.

Ainda, ao restante das culturas bacterianas presente nas microplacas foi adicionada uma solução de resazurina (Sigma-Aldrich, Darmstadt Alemanha) até a concentração final de 0,015 µg/mL por poço e as placas incubadas por aproximadamente duas horas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. A redução da resazurina ao composto fluorescente resorufina, que ocorre na presença de células vivas/com respiração ativa, foi quantificada em um leitor de placas fluorescentes Synergy H1N (BioTek, Winooski, VT) ajustado para excitação em 530 nm e emissão em 590 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas internas e repetidos três vezes.

4.11. Teste protetivo em casa de vegetação

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no período de 27 de fevereiro a 27 de março de 2024 utilizando a linhagem de *X. citri* FDC102, seguindo o descrito por Zamuner *et al.* (2023). Mudas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedade Valência (enxertados em citrumelo 'Swingle') ou *C. sinensis* (L.) Osbeck variedade Pêra (enxertadas em *Citrus limon* (L.) Osbeck), com aproximadamente 60 cm de altura, foram acondicionadas em vasos plásticos de 15 litros contendo substrato de Pinus (Multiplant Citrus, Terra do Paraíso, Holambra, SP, Brasil). Utilizou-se fertirrigação automatizada com adubo mineral misto (Amazon AgroSciences Citrus 100) em volume de aproximadamente 200 mL por planta/dia. A temperatura e a umidade foram monitoradas por meio de um termo-higrômetro digital HOB0 MX2305.

Folhas jovens de citros foram pulverizadas com os compostos fornecidos pela empresa Sta. Clara (SC – EU5); e VMIX (veículo base da formulação) e o AS – EU98

em suas respectivas concentrações bactericidas, exceto os veículos que foram testados na dose em que se encontram na formulação, até o ponto de escoamento. Para o controle positivo de infecção foi utilizado solução salina NaCl 0,85% (v/v) e para o controle negativo de infecção o agroquímico Difere ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$) (Oxiquímica Agrociência - Jaboticabal - SP, Brasil) na concentração de 20 $\mu\text{L/mL}$, conforme recomendado pelo fabricante.

Para tanto, foram pulverizados em suas respectivas proporções de acordo com a dose bactericida definida *in vitro* para cada formulação testada. Após 24 h da aplicação dos tratamentos, as plantas foram pulverizadas com uma suspensão bacteriana de *X. citri* a 10^8 células/mL (diluída em NaCl 0,85% v/v). As plantas foram então cobertas com sacos plásticos transparentes por 24 horas para manter a umidade elevada e promover infecção bacteriana. Após 30 dias pós-inoculação, as folhas foram destacadas e digitalizadas. O número de lesões por área foliar (lesões por cm^2) foi medido utilizando o software Fiji ImageJ (Schindelin et al., 2012). Foram utilizadas cinco mudas por tratamento e aproximadamente 100 folhas foram avaliadas. Os dados foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn) com três graus de liberdade utilizando o software GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo visou realizar uma abordagem da união de um óleo essencial (eugenol) a um biogel a base de polissacarídeo que tem boa capacidade de armazenamento de compostos (quitosana). Dessa forma foi possível compreender como essas amostras se relacionaram no contexto da biodegradação do bioplástico de quitosana com e sem eugenol e como esse processo atuará na capacidade antimicrobiana de combate a *Xanthomonas citri*. Diferentes concentrações de eugenol foram carregadas no biogel de quitosana (na forma de filme) para avaliar sua influência na caracterização físico-química, o que pode influenciar também no processo de biodegradação dos biogéis.

O presente estudo analisou o comportamento antimicrobiano das formulações SC – EU90; SC – EU5 e VMIX, bem como a atuação do eugenol puro (AS – EU98)

determinando sua dose bactericida e efeito protetivo contra *X. citri* em casa de vegetação.

5.1. Análises Físico-químicas do composto (SA – EU98)

Biofilmes de quitosana foram elaborados com adição das concentrações de eugenol puro (AS-EU98) em diferentes concentrações, sendo aquela que foi bactericida *in vitro* (1%) (Fig. 4) e concentrações superestimadas (4% e 8%) (Fig. 4) para simular uma possível situação real em campo para posterior estudo da consequência da biodegradação desses compostos em solo. Além disso, o biofilme de quitosana sem eugenol (Fig.4) representa o controle dessas amostras.

Após a secagem desse biogel para a confecção do bioplástico observou-se que as amostras se apresentaram transparentes, com pouca ou quase nenhuma bolha, aspecto levemente rugoso, porém ao ser manuseado tinha aspecto firme e maleável e pouco elástico, dados semelhantes foram reportados em outro trabalho com quitosana (Zamora et al., 2024). Com o aumento do eugenol o bioplástico apresentou a tendência de ficar mais amarelado e visivelmente com menos bolhas. Entretanto, testes mais específicos foram realizados para assegurar com maior clareza essas informações.

Figura 4. Bioplásticos produzidos a partir de quitosana 1%. Q: quitosana 1%; Q + SA – EU98 (1 – 8%): quitosana 1% + Eugenol puro a 1, 4 e 8% (m.m⁻¹)



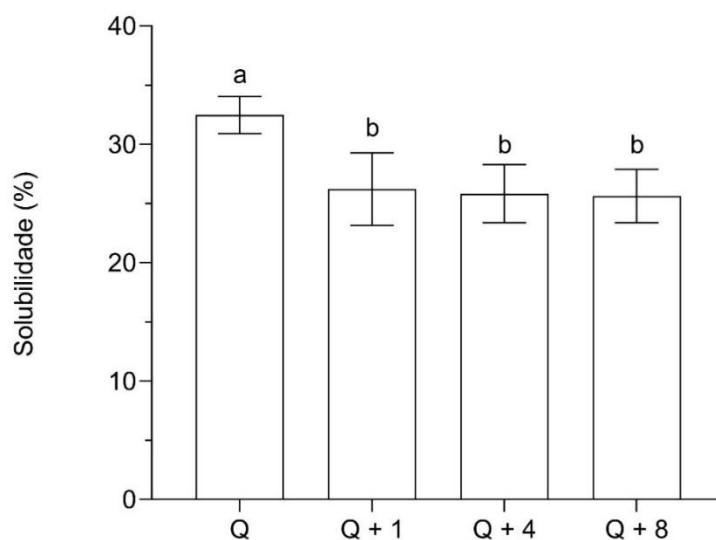
Fonte: autora

5.1.1 Solubilidade do filme de quitosana e quitosana carregada com eugenol

A solubilidade dos filmes somente quitosana (Q), e quitosana carregada com eugenol adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Q + EU98) nas concentrações 1%, 4% e 8% (m.m^{-1}) é exibida na Fig. 5. Observa-se que o filme de quitosana puro apresentou a maior solubilidade em água 32,47% ($\pm 1,5$), do que ao comparar-se com os filmes que possuem eugenol. Os valores encontrados para os filmes de quitosana são similares aos descritos por Gan et al., 2021. Já ao analisar-se os filmes contendo eugenol são estatisticamente iguais, esse fator possivelmente relaciona-se à insolubilidade do eugenol em água e que consequentemente diminui o valor do conjunto (quitosana + eugenol) no contexto da solubilidade (Ulanowska; Olas, 2021).

Figura 5. Solubilidade em porcentagem do biofilme de quitosana e quitosana carregado com eugenol nas concentrações 1%, 4% e 8% respectivamente. Sendo Q apenas quitosana; Q+1: quitosana mais eugenol 1% (m.m^{-1}); Q+4: quitosana mais eugenol 4% (m.m^{-1}); Q+8: quitosana

mais eugenol 8% (m.m^{-1}). Letras diferentes (a; b) representam grupos estatisticamente diferentes.



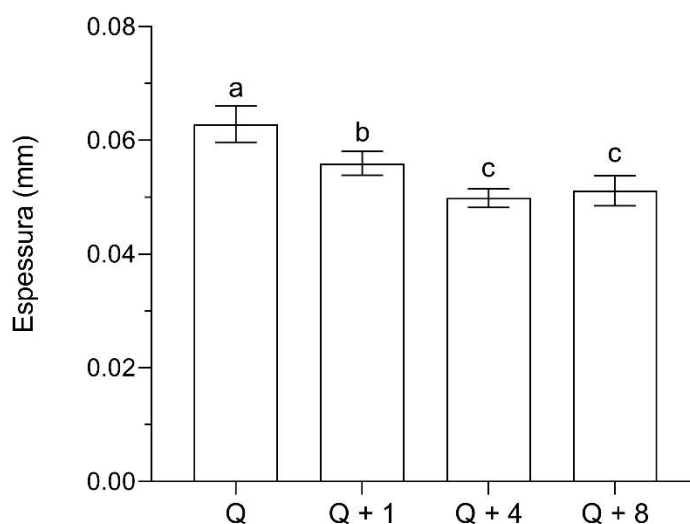
Fonte: autora

Em uma perspectiva de aplicação em campo, características físico-químicas como a redução da solubilidade consiste em uma característica positiva, uma vez que neste contexto, em campo chuvas são constantemente presentes e que poderiam ser um fator limitante para a ação do bioplástico/biogel. Logo, a adição de óleos essenciais insolúveis em água, como é o caso do eugenol (Ulanowska; Olas, 2021), podem ser um promotor na redução da umidade, como de outras características que também são citadas no presente estudo.

5.1.2. Espessura e opacidade

De acordo com a Fig. 6, a partir do aumento gradual de eugenol observa-se uma diminuição da espessura a partir do percentual em massa do mesmo. Este fator pode ser um indicativo de que a quantidade presente de eugenol com quitosana pode sofrer variações que interfiram na capacidade de permeabilidade, outro fator também consiste no método de aplicação casting, uma vez que autores já relataram uma presença de variação de espessura pelo método, além da atuação da viscosidade da amostra que dificulta a linearidade dos resultados. Além disso, sabe-se que a espessura é um dos parâmetros que influencia as propriedades dos biofilmes, a qual geralmente não é considerada em diversos estudos (Sobral et al., 2000).

Figura 6. Espessura em milímetros (mm) do biofilme de quitosana e quitosana carregado com eugenol nas concentrações 1%, 4% e 8% respectivamente. Sendo Q apenas quitosana; Q+1: quitosana mais eugenol 1% (m.m^{-1}); Q+4: quitosana mais eugenol 4% (m.m^{-1}); Q+8: quitosana mais eugenol 8% (m.m^{-1}). Letras diferentes (a; b e c) representam grupos estatisticamente diferentes.



Fonte: autora

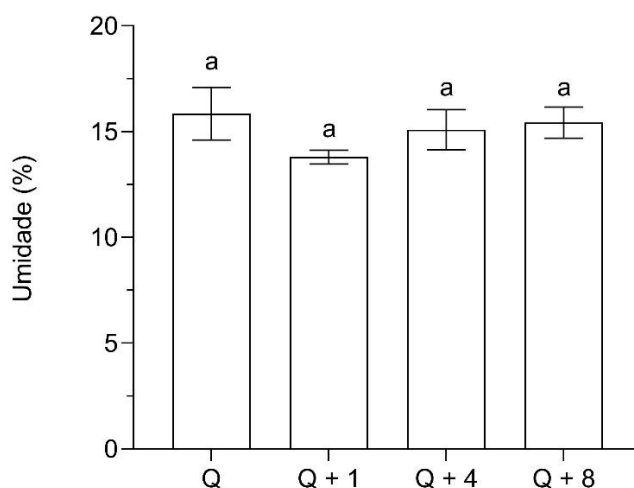
Autores como Mohammad et al. (2012) ao pesquisar blendas poliméricas de quitosana e amido pelo método casting, obtiveram valores médios de espessura de 0,20 mm, enquanto Bangyekan et al. (2006) encontraram valores médios de 0,10 mm para filmes produzidos com quitosana também pelo método casting. Abdollahi et al. (2012) encontraram valores que variaram de 0,049 a 0,052 mm para filmes de quitosana incorporados com óleos essenciais (OE's) de alecrim e nanoargila. Valores estes similares aos encontrados no presente estudo em que também se utiliza de óleos essenciais em sua composição que variaram de 0,048 a 0,065 a depender da porcentagem de OE na composição, demonstrando-se uma possível tendência na diminuição da espessura de bioplásticos de quitosana quando comparados a quitosana associada a OE's.

5.1.3. Umidade do biofilme de quitosana e quitosana carregada com eugenol

A partir da análise estatística anova, seguida de Teste Tukey (p valor < 0,05) não houve diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 7). Desta forma,

possivelmente a presença ou não de eugenol não interfira na capacidade da quitosana em perder água. Apesar dos filmes serem armazenados nas mesmas condições de temperatura e umidade, não apresentaram diferenças no padrão de absorção de água, mesmo com conteúdo de eugenol. Segundo Cuq et al., (1996) a umidade da quitosana relaciona-se com a composição própria do material, à temperatura e ao pH. Consequentemente, como ambos os tratamentos se mantiveram similares nos parâmetros de secagem nas condições de armazenamento (temperatura ambiente em dessecador). A temperatura de ebulição do eugenol consiste em 254°C (segundo ficha de informação de segurança de produto químico fornecida pela empresa Sigma-Aldrich), em decorrência disso, o eugenol possivelmente manteve-se nas amostras, visto que o eugenol também não possui afinidade com a água, os padrões de umidade consequentemente não sofreram alterações

Figura 7. Umidade em porcentagem (%) do biofilme de quitosana e quitosana carregado com eugenol nas concentrações 1%, 4% e 8% respectivamente. Sendo Q apenas quitosana; Q+1: quitosana mais eugenol 1% (m.m^{-1}); Q+4: quitosana mais eugenol 4% (m.m^{-1}); Q+8: quitosana mais eugenol 8% (m.m^{-1}). Letras iguais (a) representam grupos estatisticamente similares.



Fonte: autora

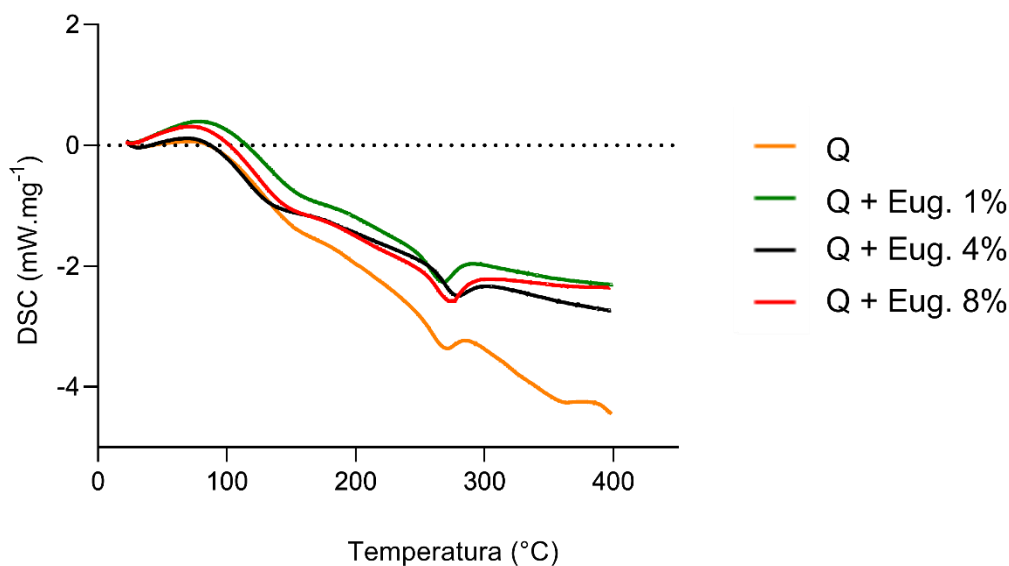
5.1.4. Análise Differential Scanning Calorimetry (DSC) de quitosana e quitosana carregada com eugenol

A partir da Fig. 8 demonstrou-se os resultados das análises de DSC, este por sua vez, possibilita a aplicação de uma ampla faixa de temperaturas permitindo

medidas de propriedades físicas, estudo de reações químicas, além da avaliação da estabilidade térmica. Sendo assim, foi possível observar que a partir de 100 °C os materiais perderam água (Parize, 2009). Esse declínio além de representar a constante perda de massa e umidade, também possibilita observar que nos valores de 200 a 300 °C ocorre a perda de água no interior do polímero presente em todos os tratamentos, além de possivelmente a perda de compostos provenientes do eugenol (Parize, 2009), visto que, a temperatura de ebulição do eugenol consiste em 254 °C.

Além disso, segundo a Fig. 8 os tratamentos de quitosana que foram associados ao eugenol apresentaram uma menor perda de massa ao comparar-se apenas quitosana, sendo um fator interessante no contexto de aplicação em campo, visto que, sugere-se uma maior estabilidade a altas temperaturas da quitosana carregada com o eugenol. Conforme a Embrapa, as temperaturas ideais para citros consistem entre 23 °C e 32 °C, valores superiores à 32 °C já são capazes de afetar as plantas. Portanto, é possível observar pela Fig. 8 que na temperatura de aplicação em campo, a temperatura não consiste, portanto, em um fator limitante no contexto de proteção contra o cancro cítrico em condições ambientais.

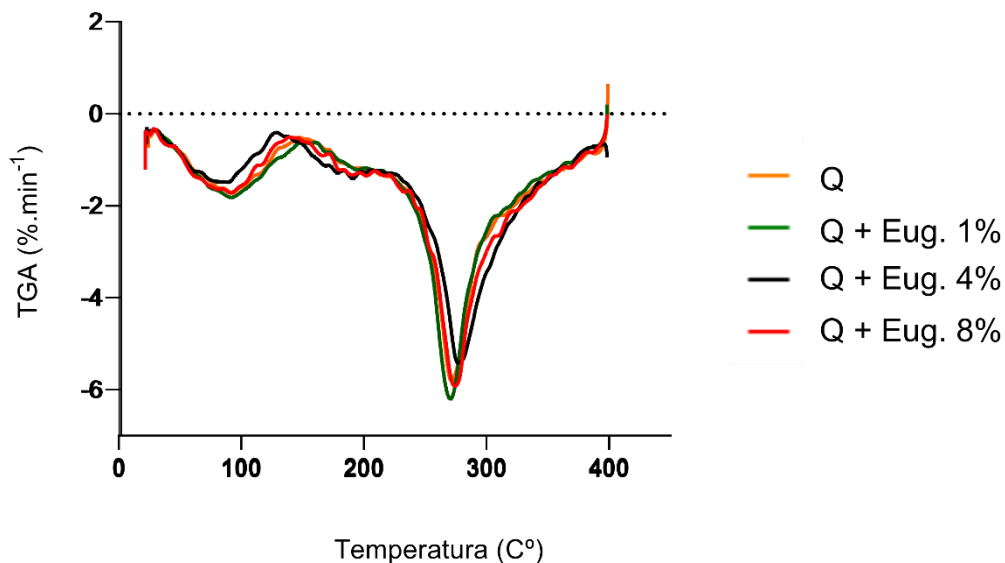
Figura 8. Análise Differential Scanning Calorimetry (DSC) do biofilme de quitosana e quitosana carregado com eugenol nas concentrações 1%, 4% e 8% respectivamente. Sendo Q apenas quitosana; Q + Eug. 1%: quitosana mais eugenol 1% (m.m^{-1}); Q + Eug. 4%: quitosana mais eugenol 4% (m.m^{-1}); Q + Eug. 8%: quitosana mais eugenol 8% (m.m^{-1}). O eixo x representa a temperatura em °C e o eixo y DSC em (mW.mg^{-1}).



Fonte: autora

De acordo com a Fig. 9 representa os resultados das análises TGA, que por sua vez puderam ser usados para estimar o grau de estabilidade das amostras testadas acima. Assim como na análise do DSC, foi possível observar variação nas mesmas faixas de temperatura, ou seja, entre 0 °C e 100 °C e entre 200 °C e 300 °C. Desta forma, possibilitou-se uma melhor visualização do deslocamento gerado por cada tratamento e observou-se que Q, Q+4 e Q+8 apresentaram um leve deslocamento reduzindo a temperatura de estabilidade, sendo um possível indicativo de que a partir de 4% de eugenol (m.m^{-1}) em relação a quitosana a amostra pode ficar mais instável. Entretanto, vale ressaltar que estudos adicionais com concentrações superiores a 8% de eugenol podem ser um fato que ajude a compreender de forma mais clara o padrão de deslocamento que a presença de eugenol pode ocasionar em biogéis a base de quitosana.

Figura 9. Análise de Termogravimetria Derivada (TGA) dos biofilmes de quitosana e quitosana carregado com eugenol nas concentrações 1%, 4% e 8% respectivamente. Sendo Q apenas quitosana; Q + Eug. 1%: quitosana mais eugenol 1% (m.m^{-1}); Q + Eug. 4%: quitosana mais eugenol 4% (m.m^{-1}); Q + Eug. 8%: quitosana mais eugenol 8% (m.m^{-1}). O eixo x representa a temperatura em °C e o eixo y TGA em ($\%.\text{min}^{-1}$).

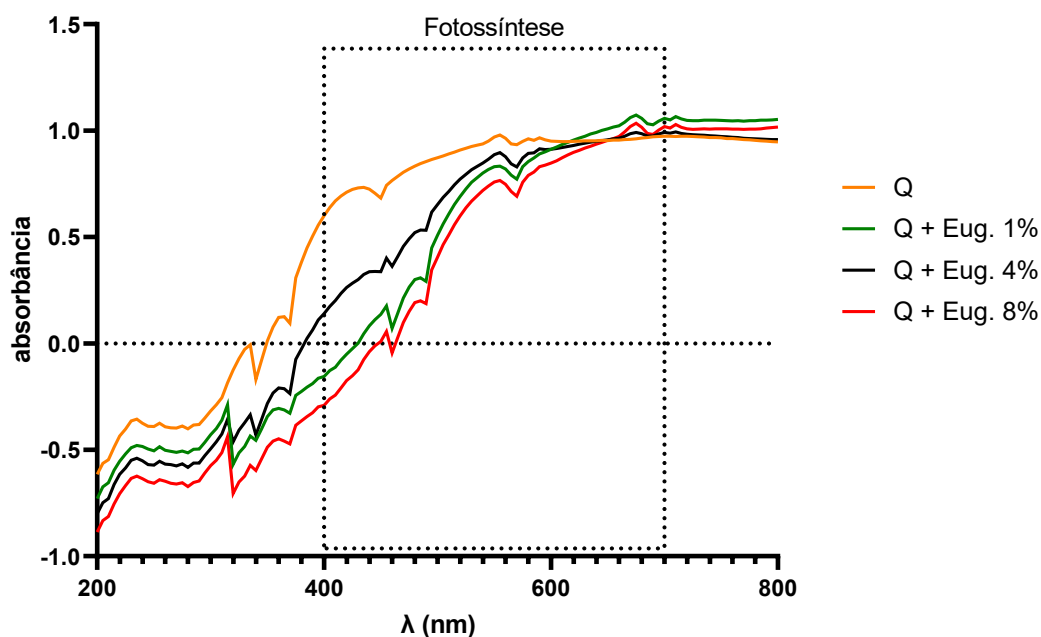


Fonte: autora

5.1.5. Absorbância UV-Vis do biofilme de quitosana e quitosana carregada

Por meio das análises estatísticas (Anova; Tuckey p valor $< 0,05$) não foram encontradas diferenças entre os grupos Q; Q + Eug. 1; 4 e 8% analisados (Fig. 10), tanto em relação ao teste de absorbância, quanto em relação ao T% (transmitância). Embora estatisticamente similares, é possível observar uma tendência quando ocorre o aumento do eugenol ao comparar-se ao controle em que há somente o biofilme de quitosana. Sendo assim, análises com valores superiores a 8% de eugenol adicionado (m.m^{-1}) podem ser testados no futuro para averiguar se de fato essa tendência existe, uma vez que diversos bioplásticos agregados a óleos essenciais podem ser elaborados no futuro em diferentes concentrações, e informações como a absorbância e transmitância são de interesse visto que as plantas utilizam-se da radiação fotossinteticamente ativa (RFA ou PAR) que está compreendida entre 390 e 760nm (denominada luz visível) (Romano, 2001).

Figura 10. Absorbância por espectro de onda (nm) dos biofilmes de quitosana e quitosana carregado com eugenol nas concentrações 1%, 4% e 8% respectivamente. Sendo Q apenas quitosana; Q + Eug. 1%: quitosana mais eugenol 1% (m.m^{-1}); Q + Eug. 4%: quitosana mais eugenol 4% (m.m^{-1}); Q + Eug. 8%: quitosana mais eugenol 8% (m.m^{-1}).



Fonte: autora

Ao afetar-se a capacidade de incidência de luz, portanto, processos fundamentais e metabólicos das plantas, como a fotossíntese podem ser afetados, fator este diretamente relacionado com a amplitude de onda de luz que a planta recebe. Sendo assim, estudos complementares para a aplicação de biofilme a base de quitosana carregado com óleos essenciais para a aplicação em campo para controle de *Xanthomonas citri* podem ser elaborados no futuro, necessita-se de um estudo mais aprofundado sobre o impacto na incidência de luz que estes ocasionam para as plantas. Desta forma, caso o bioplástico não interfira nas capacidades básicas da planta é possível sua aplicação em campo com a segurança de permanecer com o rendimento agrícola, fator fundamental do ponto de vista econômico e de saúde vegetal.

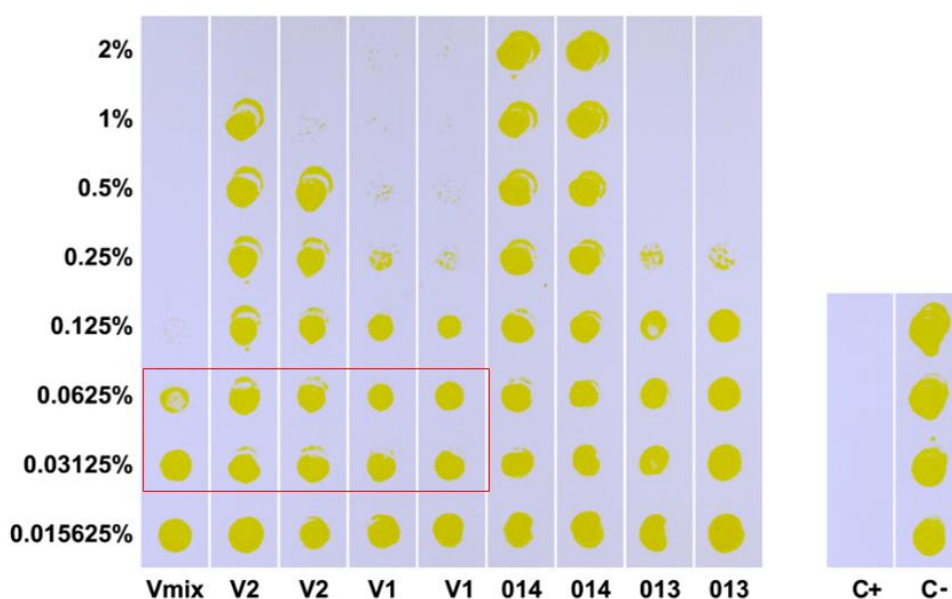
5.2 Inibição do crescimento bacteriano por eugenol e fórmula de eugenol

Os compostos utilizados no experimento da Fig. 11 são segredos industriais, portanto não foram cedidas informações complementares como, por exemplo, a composição dos veículos utilizados, ou sua concentração dentro das formulações SC – EU90 e SC – EU5 contendo eugenol. Foi informado apenas que os veículos estavam

em conjunto (VMIX) e que a dose percentual deles em conjunto não ultrapassaria 0,025%.

Todavia, estes compostos foram fornecidos separadamente (V1 e V2) o que permitiu que a análise da capacidade bactericida de cada veículo fosse realizada de maneira individualizada. Desta forma, também foi possível realizar a mistura de ambos os veículos (VMIX) na proporção percentual informada pela empresa (0,025% total), em que é possível observar na Fig.11 que não foi bactericida na dita porcentagem fornecida pela empresa. Portanto, com essas informações individualizadas dos veículos tornou-se possível visualizar a capacidade bactericida específica da atuação do eugenol. Embora, o veículo possa atuar como um potencializador bactericida, o eugenol como composto já sugere, a partir dos resultados do presente estudo, ter essa capacidade sozinho (Guimarães et al., 2019; Naddeo et al., 2020). Os valores bactericidas encontrados para o eugenol no presente estudo, portanto, são similares aos de outros trabalhos presentes na literatura (Guimarães et al., 2019; Naddeo et al., 2020).

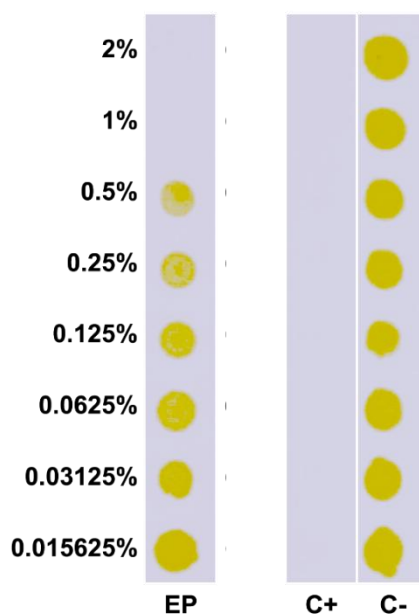
Figura 11. Placa de MBC elaborada com os compostos formulados com eugenol (Fornecidos pela empresa Sta. Clara) e seus respectivos veículos. Os compostos Vmix (V1 + V2), V2 e V1 representam os veículos utilizados nas formulações elaboradas pela empresa Sta. Clara (em vermelho valores encontrados no formulado) e as formulações 014 e 013 correspondem respectivamente a SC – EU90 e SC – EU5 com seus respectivos veículos, **(C+)** controle positivo – NYG + *X. citri*; **(C-)** controle negativo – *X. citri* + 50 µg/mL de Canamicina.



Fonte: autora

O MBC (Fig. 12) realizado contendo somente diferentes concentrações de AS – EU98 a 2% funcionou como um indicador de um possível efeito conjunto entre os veículos unidos ao óleo essencial, uma vez que, o composto formulado (SC – EU5) foi bactericida em porcentagens menores, (entre 0,5% e 0,25%) conforme a Fig. 11, do que ao comparar-se com AS – EU98 (2%) (Fig. 12). E ainda reiterando que, o eugenol por si só tem uma capacidade bactericida, porém, quando veiculada pode ser um indicativo de potencialização como ocorreu na presente análise (Fig. 11).

Figura 12. Placa de MBC elaborada com o óleo essencial puro eugenol (98%) variando de 2% a 0,015625%. **(EP)** SA – EU98; **(C+)** controle positivo – NYG + *X. citri*; **(C-)** controle negativo – *X. citri* + 50 µg/mL de Canamicina.



Fonte: autora

Ressalta-se a existência de outros trabalhos que contemplam a capacidade bactericida do eugenol, não somente contra a *Xanthomonas citri*, mas contra outros microrganismos conhecidos como, por exemplo, *E. coli*, *L. monocitogenes*, *Salmonella*, *S. aureus*. (Silva et al., 2021). Com resultados similares os autores Lade et al., 2023 ressaltaram em seu estudo que a capacidade inibitória do eugenol para *L. monocitogenes* representa atividade contra o patógeno resultando em valores bactericidas de eugenol em 1%, sendo que este foi suficiente na indução de vazamento de proteínas e lipídios nesses microrganismos (Oyedemi et al., 2009; Lade

et al., 2023). O valor encontrado para eugenol corrobora com os valores encontrados no presente estudo, visto que a capacidade bactericida do eugenol na *X. citri* ocorreu similar a 1%. A dose bactericida da formulação foi de 0,5%, para SC – EU5, enquanto para o eugenol puro (AS – EU98) foi 1%. A dosagem representa de fato que a formulação industrial potencializou o efeito do eugenol puro em cerca de 39 vezes. O composto SC – EU90 não foi bactericida no valor percentual inicial, ou seja, sua dose bactericida (caso haja) necessariamente será maior que 2% do volume total.

5.2. Biodegradação em solo em condições de casa de vegetação

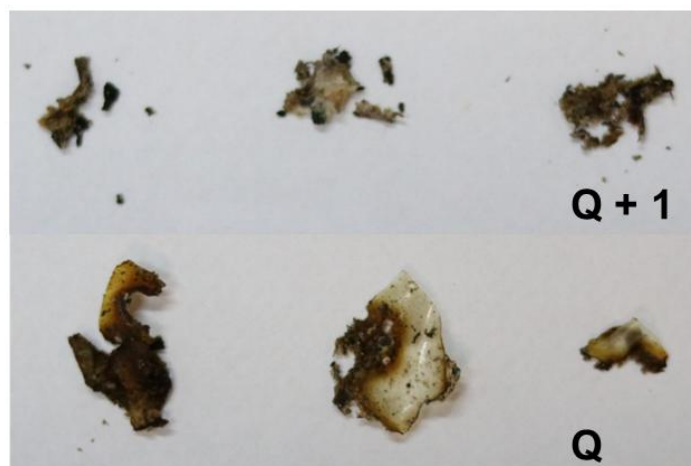
A partir das imagens do processo de biodegradação (Fig. 13-14), observou-se qualitativamente que as porcentagens com maior quantidade de eugenol foram biodegradados visualmente com maior velocidade após 30 dias de exposição. O possível fator para que ocorresse o processo consiste na possível finalização da liberação contínua do eugenol, permitindo novamente o crescimento da população de microrganismos e que conseqüentemente passaram a biodegradar novamente o filme restante contendo majoritariamente quitosana.

Figura 13. Representação visual da atividade de biodegradação dos tratamentos contendo Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol nas concentrações 1% (Q + 1:), 4% (Q + 4) e 8% (Q + 8%) em substrato Calterra – Uemura respectivamente.



Fonte: autora

Figura 14. Representação visual dos filmes biodegradados dos tratamentos contendo Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol na concentração de 1% (Q + 1), após 60 dias, respectivamente.

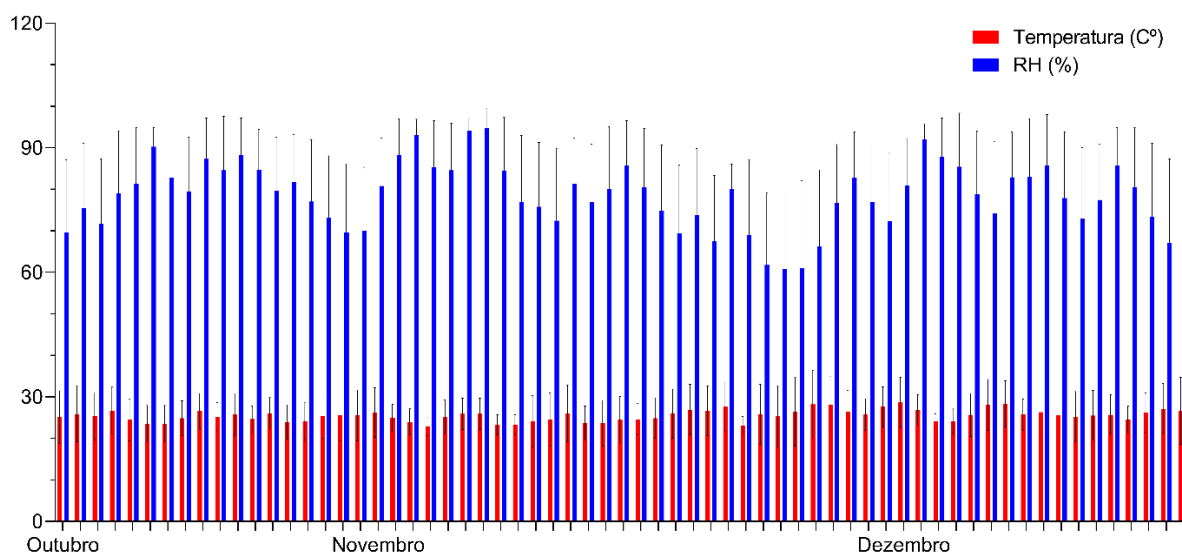


Fonte: autora

Além de parâmetros como espessura dos filmes, outros fatores acompanhados foram a temperatura (C°) e Umidade Relativa do ar (RH%) conforme observou-se na Fig. 15, esta teve como objetivo o registro dos parâmetros ao longo dos dias de exposição, desde a aclimação dos vasos a partir de 15 de outubro de 2024, até a finalização do experimento dia 17 de dezembro de 2024 e percorrendo um período de cerca de 8 semanas. Como observado a partir da Fig. 15, destaca-se as oscilações tanto na temperatura, quanto na umidade e isto decorre do fator de que o experimento foi realizado em casa de vegetação e, portanto, oscilando conforme o ambiente. Visou-se proporcionar ao processo de biodegradação os mesmos parâmetros encontrados para as mudas de citros aclimatadas para o estudo, desde a irrigação até a fertilização.

De acordo com Junior et al., (2022), em solo com umidade de 33,33%, armazenados em temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, registrou para a quitosana 1% tempo de degradação total superior 40 dias, ou seja, possivelmente pelas variações de temperatura e umidade do presente estudo, possivelmente houve influência no tempo de degradação, visto que os microrganismos possuem temperaturas e umidades determinadas conforme sua espécie para um processo ideal de degradação. Ressaltando-se, ainda, que os filmes possuíam eugenol, conforme dito anteriormente e que possivelmente também auxiliaram no aumento do tempo para a degradação dos filmes de quitosana com e sem eugenol.

Figura 15. Temperatura (C°) e Umidade Relativa do ar (RH%) da casa de vegetação ao longo do período de biodegradação dos biofilmes de quitosana com e sem eugenol no período de 15 de outubro a 17 de dezembro de 2024, respectivamente.

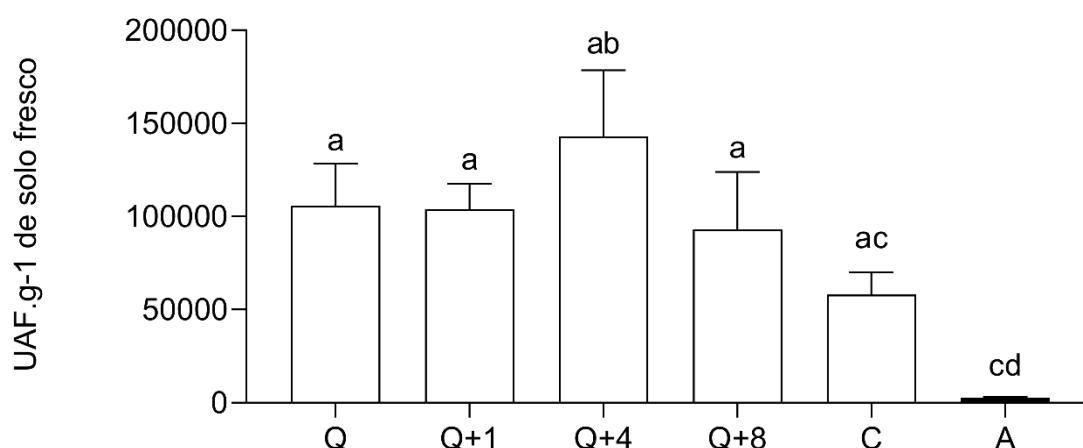


Fonte: autora

5.3. Medição da presença de atividade respiratória por resazurina

O tratamento que obteve os maiores valores de unidade de fluorescência que capta o composto fluorescente resorufina proveniente da redução da resazurina e que ocorre na presença de células vivas, com respiração ativa foi o grupo Q + 4 (Fig. 16). Os dados para a atividade respiratória foram de encontro com a atividade enzimática da β -glucosidase e Arilsulfatase, entretanto, no quesito do presente teste o grupo com quitosana + eugenol 4% (m.m^{-1}) foi maior estatisticamente (Anova e Teste Tuckey p valor $< 0,05$) do que o controle e os outros tratamentos com quitosana.

Figura 16. Taxa respiratória medida após a ação da biodegradação de quitosana e quitosana carregada com diferentes porcentagens de eugenol (m.m^{-1}) em solo de jardim. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes (p valor $< 0,05$). sendo Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol nas concentrações 1% (Q + 1:), 4% (Q + 4) e 8% (Q + 8%), C: Terra e A: Terra autoclavada, respectivamente.



Fonte: autora

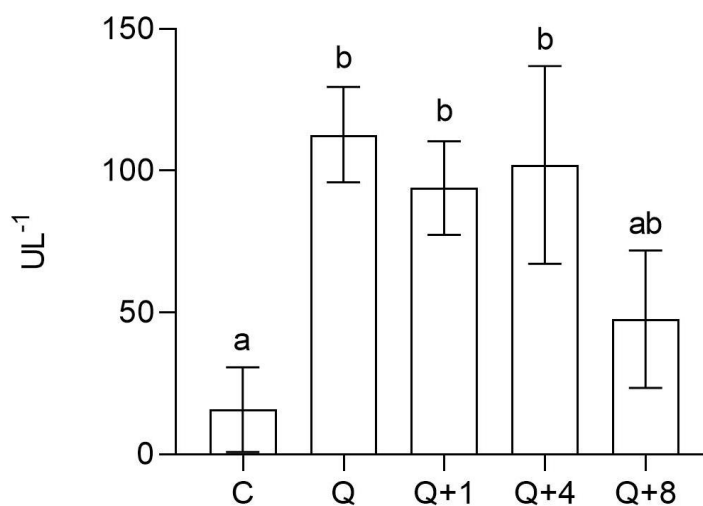
Desta forma, fatores que podem explicar esses dados consistem possivelmente no arranjo molecular do eugenol na malha polimérica da quitosana, visto que a partir das análises físico-químicas os grupos Q+4 e Q+8 apresentaram espessuras de filme menores ao comparar-se aos outros tratamentos. E segundo a literatura, a quitosana em formato de filme, pode permanecer sobre a superfície das células, englobando-as e impedindo trocas gasosas e de nutrientes (Champer et al, 2013). Fator este que explicaria a relação de diferença respiratória entre o grupo Q+4 em relação ao controle, uma vez que a quitosana pode ter fornecido fonte de carbono para o microrganismo e ao mesmo tempo, com sua menor espessura em relação aos outros grupos, favorecer um maior número de células viáveis ao comparar-se ao controle.

5.3.1. Atividade enzimática da β -glicosidase e da arilsulfatase para monitorar processo de biodegradação em solo das fitas de quitosana carregada com e sem eugenol em condições de casa de vegetação

Constatou-se a partir das análises estatísticas realizadas (Fig. 17) que o grupo (Q+8) foi estatisticamente similar ao grupo controle, bem como aos grupos contendo 1% e 4% de eugenol. Ou seja, foi possível observar uma tendência de diminuição enzimática a partir do aumento de eugenol presente no agregado com quitosana. Segundo a literatura a quitosana apresenta um largo espectro de ação antimicrobiana, como forte atividade bactericida, atividade bacteriostática contra bactérias gram-positivas (G+) e gram-negativas (G-) e ação frente a fungos e leveduras (Kong et al., 2010; Rabea et al., 2004). Fatores estes que puderam indicar a possível ocorrência

de diminuição enzimática da arilsulfatase, uma vez que, segundo Nicholls e Roy, (1971) grupos de microrganismos como *Actinobacteria* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.; *Raoultella* sp.; *Trichoderma* sp. e *Eupenicillium* sp. estão diretamente correlacionados com a atividade da arilsulfatase. Além disso, pelo fato de a arilsulfatase ser uma enzima que catalisa a hidrólise do éster de sulfato orgânico comumente em solos (Kertesz e Mirleau, 2004), pode-se sugerir que a presença de quitosana e eugenol no solo, dependendo de suas concentrações, podem influenciar na captação de sulfato e consequentemente interferir em atividades metabólicas das plantas se aplicado em concentrações muito altas, ou seja, superior a 8% de eugenol (m.m^{-1}) em relação a quitosana. A quitosana em biogel carregado com eugenol será aplicada em campo por pulverização, entretanto, parte pode chegar ao solo, acarretando tais efeitos dependendo da sua concentração.

Figura 17. Presença enzimática arilsulfatase (UL^{-1}) após a ação da biodegradação de quitosana e quitosana carregada com diferentes porcentagens de eugenol (m.m^{-1}) em substrato Calterra – Uemura. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes (p valor $< 0,05$). sendo C: Terra, Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol nas concentrações 1% (Q + 1:), 4% (Q + 4) e 8% (Q + 8%) respectivamente.



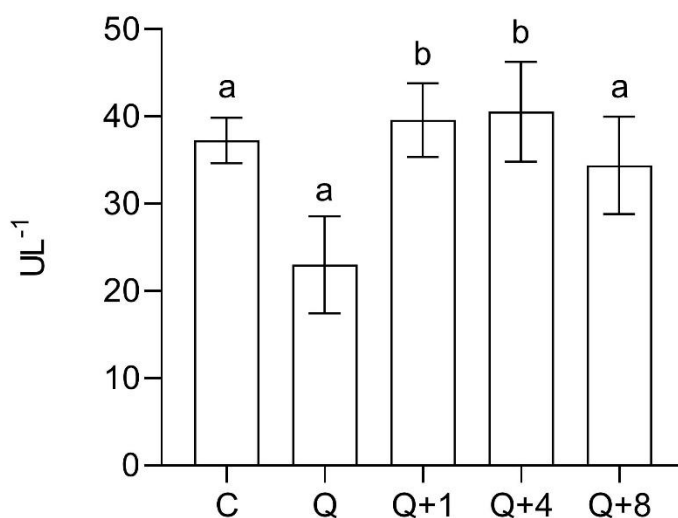
Fonte: autora

Diante da Fig. 18. observou-se que a partir das análises estatísticas realizadas os grupos (Q+1 e Q+4) foram estatisticamente similares e distinguiram-se dos grupos (C; Q e Q+8). Segundo a literatura, a enzima é caracteristicamente útil como bioindicadora da qualidade do solo e pode refletir a atividade biológica passada, bem

como a capacidade do solo para estabilizar a matéria orgânica do solo (MOS) (Bandick e Dick, 1999; Ndiaye et al., 2000).

Geralmente, a atividade da β -glicosidase pode fornecer evidências avançadas de alterações no carbono orgânico sendo relevante no controle da qualidade do solo (Joachim e Patrick, 2008). Sendo assim, ao analisar-se a figura 17 é possível identificar que a presença de quitosana com eugenol em 1 e 4% podem ser indutoras no aumento enzimático e que valores superiores, ao contrário da atividade da arilsulfatase, pouco ou nada interferem. Entretanto, estudos podem ser realizados para avaliar a tendência de valores superiores a 8% de eugenol com quitosana.

Figura 18. Presença enzimática (UL^{-1}) da β -glucosidase após a ação da biodegradação de quitosana e quitosana carregada com diferentes porcentagens de eugenol ($m.m^{-1}$) em substrato Calterra – Uemura. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes (p valor $< 0,05$). sendo C: Terra, Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol nas concentrações 1% (Q + 1:), 4% (Q + 4) e 8% (Q + 8) respectivamente.



Fonte: autora

5.4. Atividade microbiana em solo após biodegradação de filme de quitosana e quitosana carregada com eugenol

A partir do observado (Fig. 19) tanto em bactérias, quanto em fungos filamentosos nenhum tratamento causou alteração estatística no número de microrganismos presentes no solo. Ou seja, nesse caso, o aumento de eugenol presente com a quitosana não foi capaz de exercer um papel bactericida maior. Sendo

assim, o fator que pode explicar esses resultados consiste na baixa estabilidade química do eugenol. Disponibilizando-o mais facilmente à oxidação e a muitas interações bioquímicas (Marchese et al., 2017). Fator que explicaria o encapsulamento do eugenol com a quitosana ter apresentado uma tendência na melhora da estabilidade térmica (DSC) obtida no presente estudo. Desta forma, a liberação para o meio pode ter sido lenta devido ao encapsulamento do eugenol pelo biogel de quitosana e após liberado e em contato com a terra o eugenol que possivelmente foi disponibilizado em pequenas quantidades oxidou-se e consequentemente causou pouco impacto na comunidade microbiana no solo, visto que estes estão presentes em grandes quantidades.

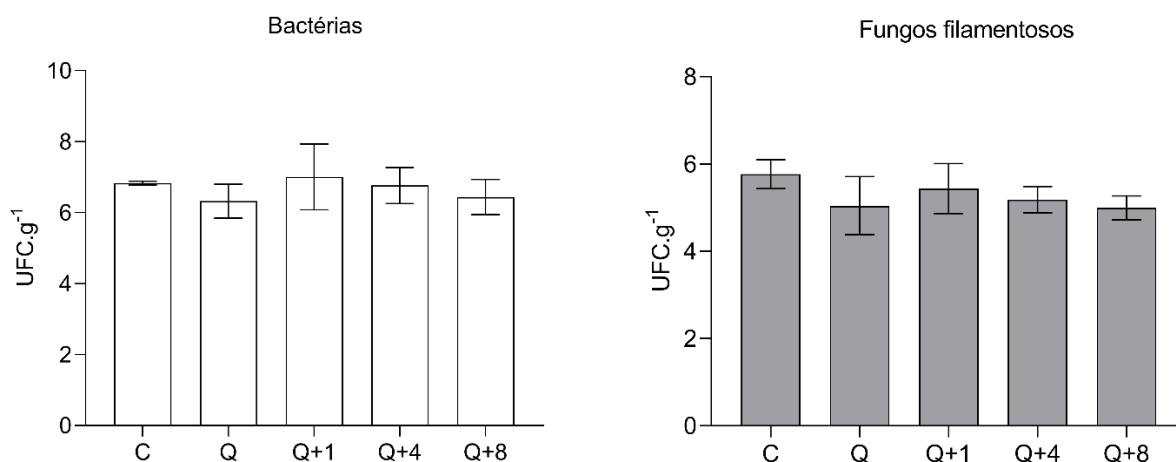
Segundo Wrońska et al., (2023) o período médio de biodegradação de bioplásticos a base de quitosana levou cerca de 6 a 8 semanas, em que o solo foi mantido em temperatura ambiente, com 45% de umidade. Com a presença do eugenol, a biodegradação levou cerca de 60 dias e não foi completa para todos os filmes no presente estudo, em decorrência de os materiais ficarem acomodados em casa de vegetação possuindo variação de umidade e temperatura, possivelmente retardou a velocidade de degradação dos filmes. A taxa de degradação pode depender amplamente da massa molecular e do seu grau de desacetilação (Zhang e Neau, 2001), além disso segundo a literatura a quitosana com menor peso molecular é degradada mais rapidamente (Elieh-Ali-Komi e Hamblin, 2016; Croisier e Jérôme, 2013), ou seja, diversos parâmetros devem ser contabilizados quando se observa o contexto de biodegradação de materiais.

De acordo com Maron e Ranjard, (2011), temperaturas diferentes podem alterar a atividade biológica no solo, visto que, essas características são determinadas de acordo com cada grupo de microrganismo. Portanto, sabendo-se que solo e os microrganismos que o habitam são heterogêneos, e obter amostras uniformes consiste em um processo dificultoso no contexto microbiológico, descrever com precisão as relações ecológicas requer diversos dados complementares (Maron e Ranjard, 2011).

Desta forma, experimento com mais períodos de coleta seria o indicado para que fosse possível acompanhar o padrão de crescimento desses microrganismos, além de uma avaliação das espécies dos microrganismos que estão presentes nesse

solo com a finalidade de compreender de maneira mais detalhada a relação da atividade do bioplástico de quitosana com as diferentes concentrações de eugenol em diversos momentos diante do impacto da biodegradação na biodiversidade microbiana são necessários.

Figura 19. Quantidade de Bactérias e Fungos filamentosos em UFC.g⁻¹ em diferentes tratamentos sendo C: Terra, Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol nas concentrações 1% (Q + 1:), 4% (Q + 4) e 8% (Q + 8%) respectivamente.



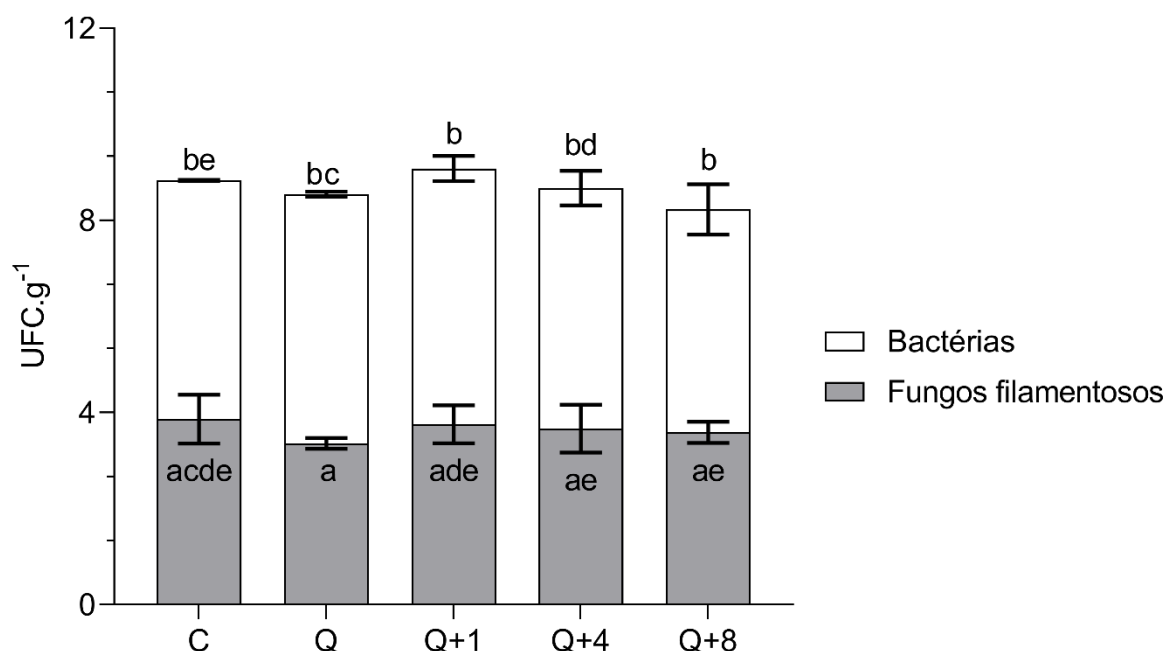
Fonte: autora

De acordo com a Fig. 20, o grupo de bactérias em UFC.g⁻¹ foi maior ao comparar-se com o grupo de fungos filamentosos. Diversos fatores podem impactar o crescimento dos microrganismos como a umidade, temperatura, pH, além da massa molecular e grau de acetilação da quitosana (Champer et al, 2013). Essas características moldam o processo de biodegradação e capacidade bactericida das quitosanas, sendo que cada uma delas podem agir de formas distintas nos microrganismos. Desta forma, a quitosana carregada com eugenol possivelmente proporcionou um meio de crescimento mais seletivo para os fungos do que para as bactérias, os fungos possuem características diferentes das bactérias, já que são organismos eucarióticos e considerando-se que a liberação do eugenol possivelmente foi lenta e contínua devido o processo de encapsulamento, os fungos foram impactados sistemicamente devido o tempo de reprodução e as especificidades destes organismos e que eventualmente não impactaram da mesma forma as bactérias, visto que o eugenol é facilmente absorvido por diversos organismos

(Marchese et al., 2017). Portanto, ressalta-se novamente a necessidade de compreender melhor qual grupos de microrganismos que podem estar presentes para assim compreender os mecanismos metabólicos envolvidos em cada processo.

Dentre essas formas de ação têm-se, o rompimento da membrana celular e a quelação com nutrientes que podem interagir com as cargas positivas dos grupos NH_3^+ das cadeias de quitosanas e as cargas negativas presentes na membrana ou parede celular dos microrganismos, além disso, o menor grau de acetilação pode resultar em uma maior atividade (Fang et al., 2010). Já a interação com o DNA do microrganismo é associada a baixa massa molecular que permite a quitosana em permear para o interior das células (Park et al., 2011). Já a quitosana em formato de filme, proposto no presente estudo tem a capacidade de ficar sobre superfície das células, englobando-as e impedindo trocas gasosas e de nutrientes, sendo atribuída ao uso de quitosanas com alta massa molecular (Champer et al, 2013).

Figura 20. Comparação estatística entre a quantidade de Bactérias e Fungos filamentosos em UFC.g⁻¹ em diferentes tratamentos sendo C: Terra, Q: Quitosana, e quitosana carregada com eugenol nas concentrações 1% (Q + 1:), 4% (Q + 4) e 8% (Q + 8%) respectivamente.

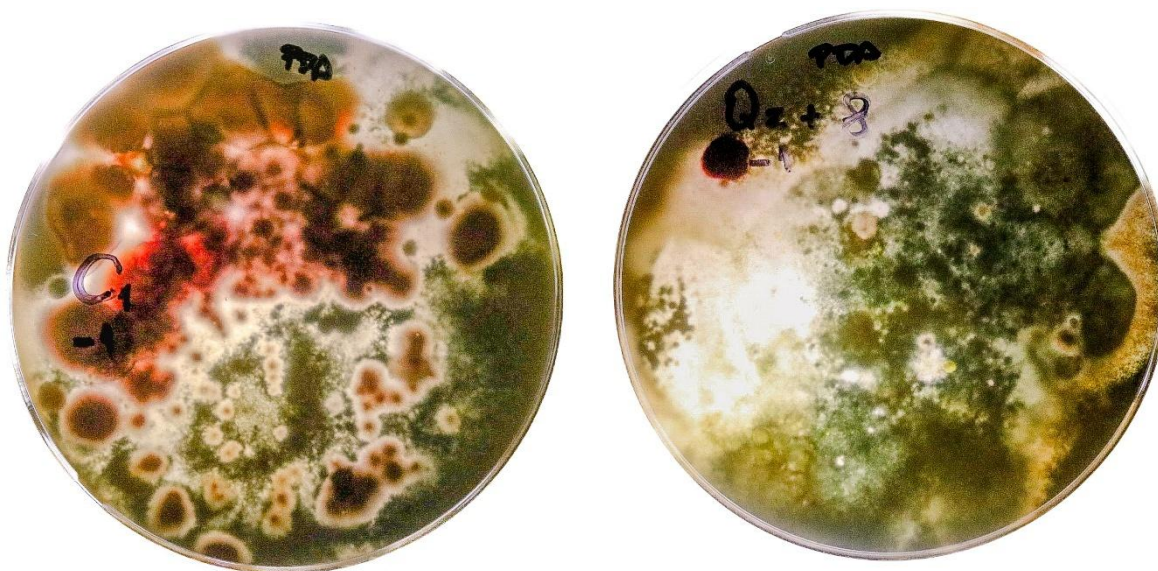


Fonte: autora

Outro fator de destaque, porém qualitativo, consiste na visualização da redução de diversidade fúngica presente nas placas (Fig. 21), conforme o aumento da

concentração de eugenol no solo, conforme observados nas figuras a seguir, em que a figura da esquerda consiste somente no plaqueamento de fungos da terra e o da direita quitosana com eugenol 8% (m.m^{-1}):

Figura 21. Placas contendo apenas terra e quitosana + 8% (m.m^{-1}) eugenol em meio PDA respectivamente.



Fonte: autora

A partir das imagens (Fig. 21), observou-se uma possível mudança no perfil de fungos presentes na placam de quitosana + eugenol 8% sendo um indicativo de que diferentes concentrações de eugenol podem gerar uma pressão de crescimento em alguns grupos de fungos, porém, pesquisas mais aprofundadas seriam necessárias para realizar a classificação desses microrganismos.

5.5. Avaliação da ecotoxicidade em sementes

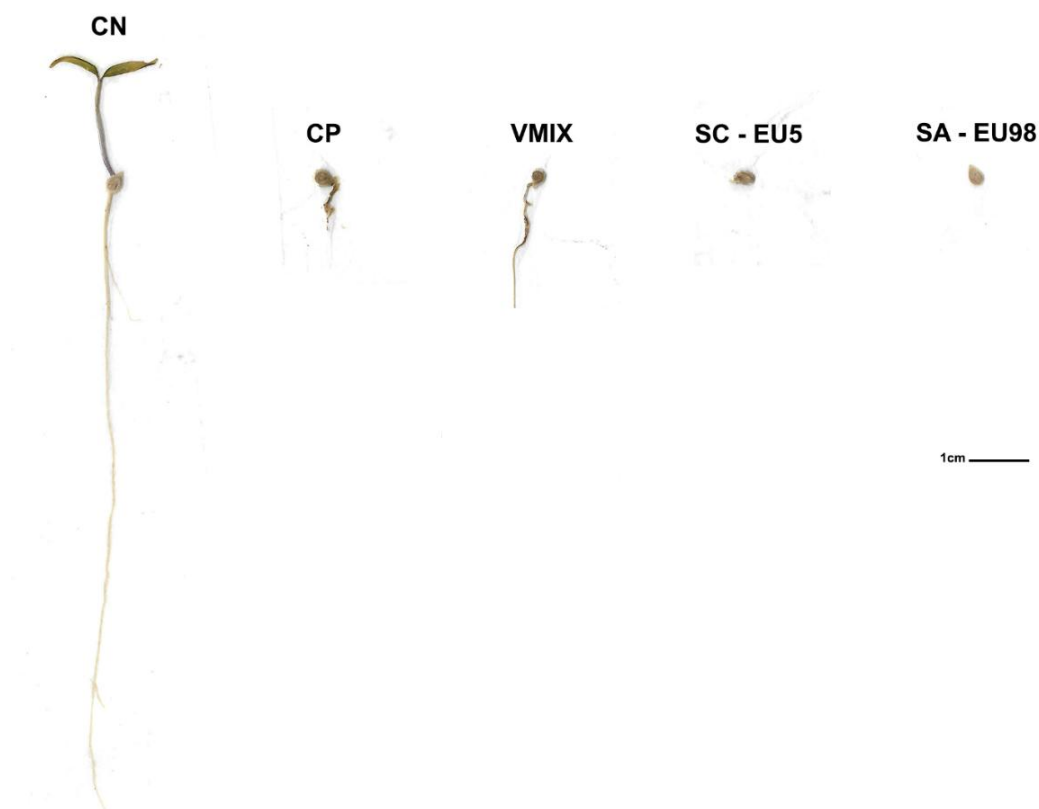
Ensaio de germinação de sementes foram elaborados para avaliar a atividade fitotóxica do eugenol utilizado no presente estudo, sendo eles (SC – EU5 - 0,5%) e (AS – EU98 - 1%). Além disso, de forma complementar testou-se o VMIX (Controle do veículo – 0,025%), água destilada (controle negativo – CN) e Sulfato de zinco (controle positivo – ZnSO_4 0,02M). Sendo assim, foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) (ISLA® lote: 169035-007) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (ISLA® lote: 170560-011). Ressalta-se que as amostras foram as mesmas para alface e tomate e os valores em porcentagem (0,5% e 1%) correspondem a testes *in vitro* realizados anteriormente, valor este em que as amostras foram bactericidas contra a *X. citri*.

Os resultados obtidos pela fórmula do Índice de Germinação (GI%), Cálculos de Sementes Germinadas (G%) e Elongação Radicular (ER%) foram semelhantes tanto para alface (*Lactuca sativa*) quanto para o tomate (*Solanum lycopersicum*). Para o (GI%) em ambas as espécies apenas o CN (água destilada) não foi categorizado como tóxico e o mesmo ocorre na (ER%) de ambas. A única porcentagem que se mostrou diferente foi (G%) que em ambas as espécies o VMIX (veículo das formulações) e o CN (água destilada) não apresentaram um cenário tóxico, visto que valores entre 120 e 80 indicam que os compostos avaliados pouco ou nada interferem na germinação e crescimento das sementes; valores abaixo de 80 indicam efeitos tóxicos relacionados a presença dos compostos avaliados (Pecora et al. 2018). Desta forma, todas as outras amostras restantes configuraram-se como tóxicas, uma vez que apresentaram valores inferiores a 20% (Fig. 25 a 29). Porém esses valores são frequentemente encontrados em estudos de fitotoxicidade em óleos essenciais (Zamuner et al., 2023).

Dados similares ao do presente estudo também foram encontrados em outros estudos (Garbim et al., 2014; Dias et al., 2021) que correlacionam alguns óleos essenciais como, por exemplo, o capim limão (*Cymbopogon citratus*) a efeitos fitotóxicos em sementes de *Lactuca sativa*. Além disso os pesquisadores Ahuja et al., (2015) analisaram a atuação do eugenol na diminuição da germinação em *Avena fatua*. Os dados obtidos pelos pesquisadores Ahuja et al., (2015) mostram que a germinação, a raiz e o comprimento do coleóptilo declinaram de forma dose-resposta após a exposição ao eugenol. Sendo que, o comprimento da raiz declinou ($p \leq 0,05$) em ~38%, 58%, 68% e 81% após a exposição a 100, 250, 500 e 1000 μM de eugenol, respectivamente (Ahuja et al., 2015).

A capacidade fitotóxica do eugenol segundo o artigo, ocorre devido um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a possível explicação é que danificam os componentes celulares como o DNA, proteínas e membranas (Ahuja et al., 2015). Sendo assim, a atuação do eugenol diminuindo todos os índices abordados no presente estudo em alface (*Lactuca sativa*) e em tomate (*Solanum lycopersicum*) possivelmente deve-se ao fato de um aumento de produção de espécies reativas de oxigênio que danificam a célula vegetal e, portanto, sendo tóxica para a planta.

Figura 22. Efeito dos compostos testados em sementes de *S. lycopersicum*. Sendo, CN: água destilada; CP: ZnSO₄; VMIX: veículo do composto SC – EU5; SC – EU5: formulação da empresa Sta. Clara com eugenol (5%) a 0,5% (v/v) e SA – EU98: eugenol puro 98% a 1% (v/v).



Fonte: autora

Figura 23. Efeito dos compostos testados em sementes de *L. sativa*. Sendo, CN: água destilada; CP: ZnSO₄; VMIX: veículo do composto SC – EU5; SC – EU5: formulação da empresa Sta. Clara com eugenol (5%) a 0,5% (v/v) e SA – EU98: eugenol puro 98% a 1% (v/v).



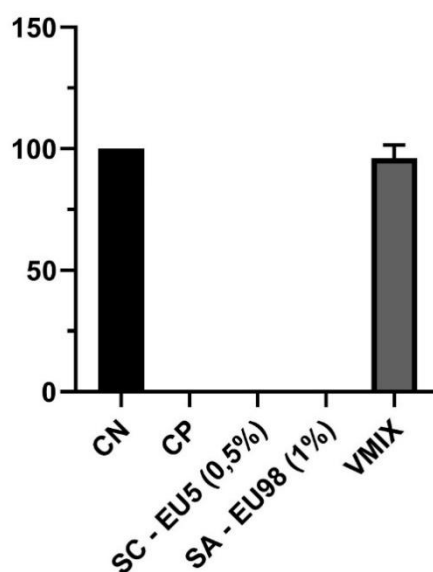
Fonte: autora

Figura 24. Placas contendo sementes de tomate após sete dias de incubação em água destilada



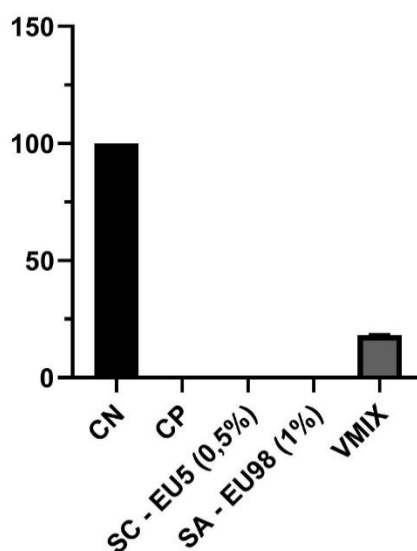
Fonte: autora

Figura 25. Índice de Sementes Germinadas (G%) do tomate (*Solanum lycopersicum*) (ISLA[®] lote: 170560-011) na presença dos controles positivo (ZnSO_4 – 0,02M), negativo (água destilada), compostos ativos: SC – EU5 (0,5%), SA – EU98 (1%) e VMIX (controle do veículo – 0,025%)



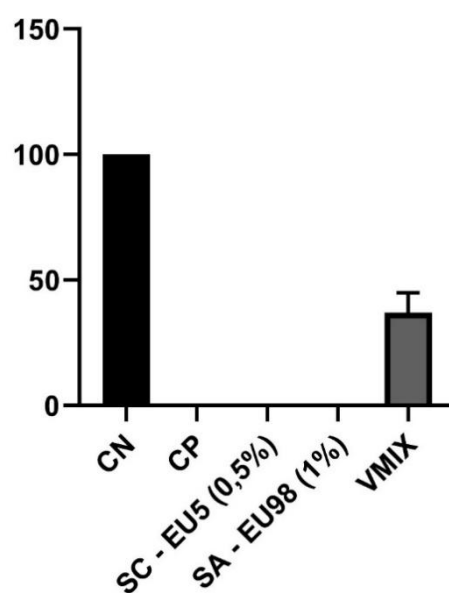
Fonte: autora

Figura 26. Índice de germinação do tomate (*Solanum lycopersicum*) (ISLA® lote: 170560-011) na presença dos controles positivo (ZnSO_4 – 0,02M), negativo (água destilada), compostos ativos: SC – EU5 (0,5%), SA – EU98 (1%) e VMIX (controle do veículo – 0,025%).



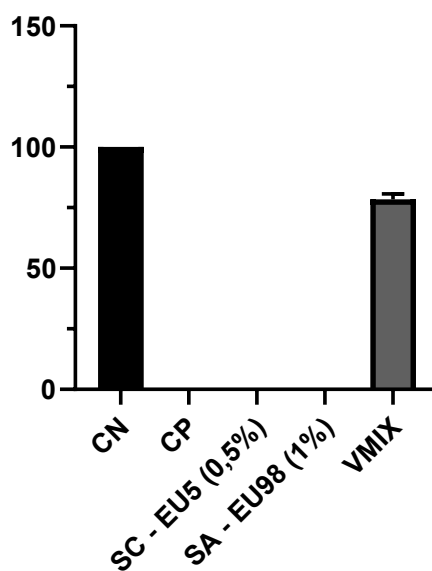
Fonte: autora

Figura 27. Elongação radicular relativa do tomate (*Solanum lycopersicum*) (ISLA® lote: 170560-011) na presença dos controles positivo (ZnSO_4 – 0,02M), negativo (água destilada), compostos ativos: SC – EU5 (0,5%), SA – EU98 (1%) e VMIX (controle do veículo – 0,025%).



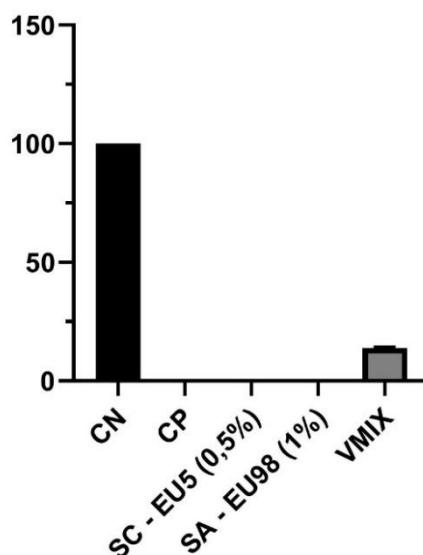
Fonte: autora

Figura 28. Número de sementes germinadas de alface (*Lactuca sativa*) (ISLA[®] lote: 169035-007) na presença dos controles positivo (ZnSO_4 – 0,02M), negativo (água destilada), compostos ativos: SC – EU5 (0,5%), SA – EU98 (1%) e VMIX (controle do veículo – 0,025%).



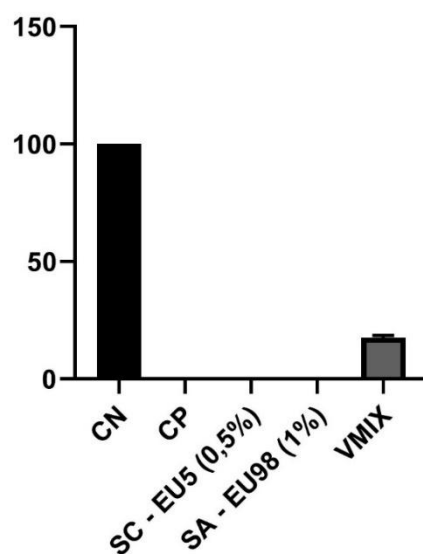
Fonte: autora

Figura 28. Índice de germinação da alface (*Lactuca sativa*) (ISLA® lote: 169035-007) na presença dos controles positivo (ZnSO_4 – 0,02M), negativo (água destilada), compostos ativos: SC – EU5 (0,5%), SA – EU98 (1%) e VMIX (controle do veículo – 0,025%).



Fonte: autora

Figura 29. Elongação radicular relativa da alface (*Lactuca sativa*) (ISLA® lote: 169035-007) na presença dos controles positivo (ZnSO_4 – 0,02M), negativo (água destilada), compostos ativos: SC – EU5 (0,5%), SA – EU98 (1%) e VMIX (controle do veículo – 0,025%).



Fonte: autora

Desta forma, ainda segundo Pecora *et al.* (2018) e a partir dos índices de germinação obtidos para *Lactuca sativa* e *Solanum lycopersicum* no presente estudo, todas as análises resultaram em valores abaixo de 80% no índice de germinação (GI%) para ambas as espécies utilizadas e que, portanto, indicam efeitos tóxicos relacionados a presença dos compostos ativos aqui avaliados.

5.6. Inibição do crescimento bacteriano

As concentrações bactericidas definidas *in vitro* para cada formulação foram utilizadas posteriormente em testes subsequentes realizados em casa de vegetação (Tabela 1). O composto formulado SC – EU5 mesmo que com a presença de apenas 5% da composição total de eugenol, mostrou-se mais eficaz no impedimento do crescimento das colônias bacterianas de *X. citri* quando comparado ao formulado SC – EU90 com a presença de 90% de sua composição sendo eugenol, este fator deve-se possivelmente por um efeito potencializador proporcionado pelo veículo (VMIX) que está em conjunto com o formulado SC – EU5. Desta forma, o composto SC – EU90 formulado não entrou nos testes posteriores, pois o mesmo não seria economicamente viável pensando em uma aplicação em grande escala, por ter mais eugenol e baixo efeito bactericida.

Cabe ressaltar que os valores percentuais bactericidas observados no teste MBC pelo formulado SC – EU5 e pelo SA – EU98 foram próximos, entretanto, vale ressaltar que percentualmente o eugenol encontra-se em quantidade inferior no composto SC – EU5 e mesmo assim obtiveram semelhança, sendo mais um indicativo de que existe um possível efeito potencializador dos veículos utilizados.

Tabela 1. Concentrações bactericidas definidas em ensaios de microtitulação e que foram utilizados em casa de vegetação contra o fitopatógeno *X. citri* subsp. *citri*.

Formulação	Concentração Bactericida (% v/v)	Concentração de Ativo ^a Presente (% v/v)	Concentração máxima de veículo presente (% v/v)
SC – EU5 ^b	0,5	0,025	0,025
SA – EU98 ^c	1,0	-	-

^a O princípio ativo foi considerado como sendo Eugenol para as formulações que utilizaram como base o composto puro;

^b SC – EU5: formulação Sta. Clara com 5% de eugenol em sua composição;

^c SA – EU98: Eugenol Sigma puro $\geq 98\%$ de pureza em sua composição;

5.7. Potencial protetivo do eugenol e formulação em casa de vegetação

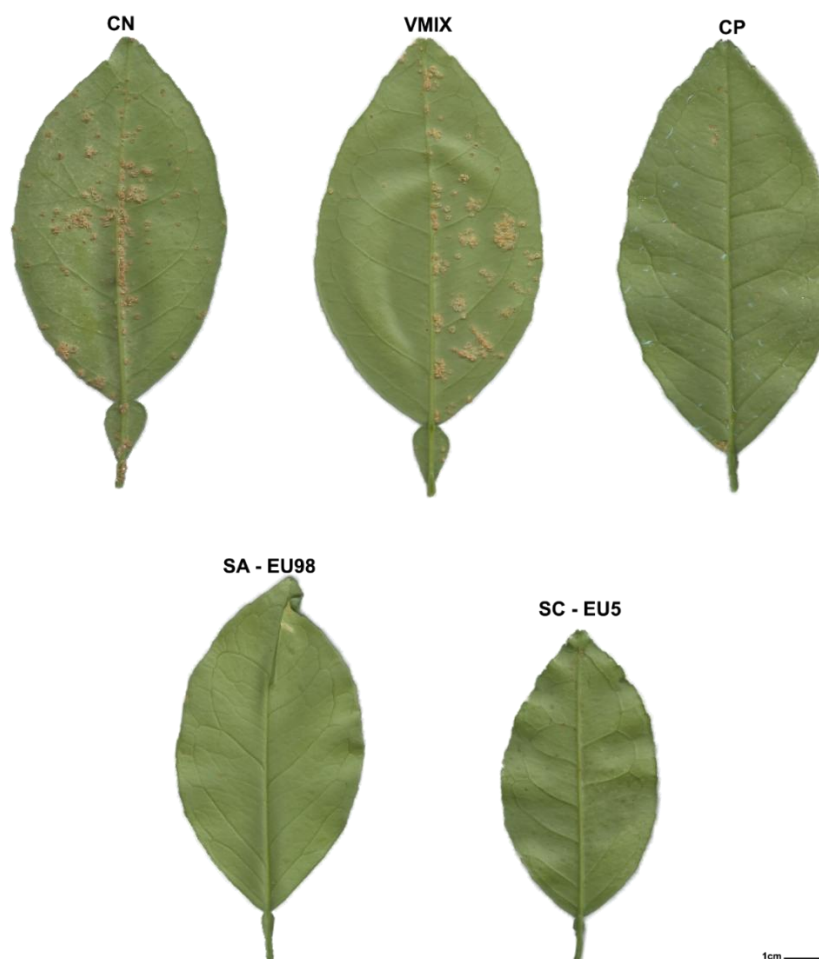
Os tratamentos designados como Controle Positivo Cobre (Cu), SC – EU5 e SA – EU98 (Fig. 30) foram considerados estatisticamente diferentes do tratamento do controle negativo (salina 0,85% v/v). Ainda, não houve diferença significativa entre os tratamentos com os veículos e o tratamento controle, indicando que sem a presença dos princípios ativos não há diminuição significativa no desenvolvimento de sintomas de cancro cítrico. O composto SC – EU5 reduziu em 7,4 vezes o número de lesões ($1,364 \pm 0,934$ lesões/cm²) em relação ao controle da salina ($10,17 \pm 3,751$ lesões/cm²), o composto SA – EU98 reduziu em 5,7 vezes o número de lesões ($1,759 \pm 1,518$ relação ao controle da salina ($10,17 \pm 3,751$ lesões/cm²) em relação ao controle da salina ($10,17 \pm 3,751$ lesões/cm²) e o Cobre reduziu em 9,2 o número de lesões ($1,099 \pm 0,9038$ lesões/cm²) vezes em relação ao controle da salina ($10,17 \pm 3,751$ lesões/cm²)

Segundo o trabalho realizado pelos pesquisadores Zamuner et al.,2023 os mesmos também trabalharam com a aplicação de óleos essenciais (carvacrol, óleo essencial de orégano e timol) em casa de vegetação. Neste estudo, os óleos quando comparados ao controle negativo (Difere a 20 µL/mL) apresentaram uma boa redução no número de lesões, fator este que também ocorreu no presente estudo, já que os óleos/fórmulas (SA – EU98 e SC – EU5) (Fig. 31) também reduziram significativamente o número de lesões quando comparado com o controle Difere (Cu).

Em ambos os casos, tanto na pesquisa realizada por Zamuner et al.,2023 quanto nesta, pressupõe-se a mesma medida de atuação dos óleos, visto que, segundo a literatura o eugenol, assim como o timol e o carvacrol, possui uma possível capacidade de interação com a membrana celular da bactéria *X. citri*. Desta forma, conclui-se que ambos os compostos com o eugenol (SA – EU98 e SC – EU5) possuem bom desempenho quando comparados ao controle cobre, que consiste em um interesse de pesquisa a redução do uso do cobre contínuo no tratamento de *X. citri*, uma vez que consiste em um dano ambiental que pode ser reduzido por alternativas

mais ambientalmente corretas. Além disso, é possível observar que o veículo elaborado pela empresa Sta. Clara assemelhou-se estatisticamente ao controle de salina, corroborando com os dados previamente encontrados nas análises *in vitro*, em que o veículo não foi capaz de conter o crescimento bacteriano.

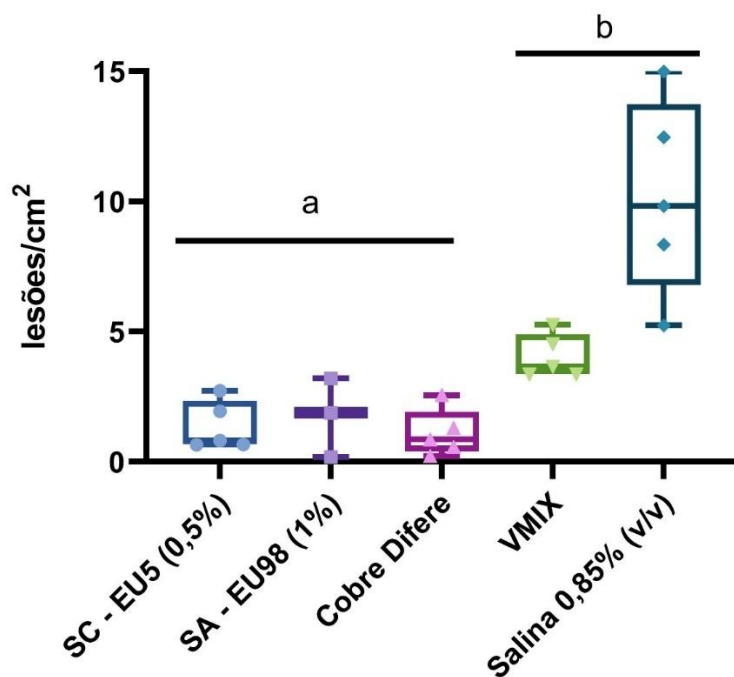
Figura 30. Exemplares de folhas de *Citrus sinensis* (L.) Pêra (enxertados em citrumelo 'Swingle') retirados após o término do experimento em casa de vegetação. Sendo, CN: salina 0,85% (v/v); VMIX: veículo do composto SC – EU5; CP: Cobre Difere; SA – EU98: Eugenol puro 98% a 1% e SC – EU5: eugenol formulado pela empresa Sta. Clara com 5% de eugenol a 0,5%.



Fonte: autora

Figura 31. Número de lesões por cm² em folhas de *Citrus sinensis* (L.) Pêra (enxertados em citrumelo 'Swingle') submetidas tratadas com diferentes formulações e seu respectivo veículo. Sendo, SC – EU5: eugenol formulado pela empresa Sta. Clara com 5% de eugenol a 0,5%;

SA – EU98: Eugenol puro 98% a 1%; Cobre Difere: controle positivo; VMIX: veículo do composto SC – EU5 e salina 0,85% (v/v): controle negativo. As letras (a, b) representam grupos nos quais não foram identificadas diferenças estatísticas significantes com relação ao controle negativo (Cobre Difere).



Fonte: autora

6. CONCLUSÃO

O presente estudo analisou a eficácia antimicrobiana de diferentes formulações de eugenol, destacando-se as formulações SC – EU5 e SA – EU98. O composto SC – EU5, contendo 0,5% de eugenol, demonstrou ser bactericida em concentrações

menores do que o eugenol puro (AS – EU98) a 1%. As formulações foram testadas também em casa de vegetação e demonstraram redução no número de lesões de *Xanthomonas citri*, quando comparadas ao controle (cobre Difere). Os resultados indicam, também, que as amostras com maior concentração de eugenol apresentaram biodegradação visualmente mais acelerada somente após 30 dias de exposição, possivelmente devido à finalização da liberação prolongada do composto. Já em relação à atividade enzimática para monitorar biodegradação, observou-se que concentrações de eugenol em 1% e 4% (m.m^{-1}) favoreceram o aumento da atividade da β -glicosidase, enzima associada à degradação do carbono orgânico e à qualidade do solo. No entanto, para concentrações superiores, essa atividade enzimática não apresentou variações significativas. Por outro lado, a atividade da arilsulfatase, enzima envolvida na hidrólise de sulfatos orgânicos, mostrou uma tendência de redução à medida que a concentração de eugenol aumentava, sendo que o grupo com 8% (m.m^{-1}) apresentou atividade estatisticamente similar ao controle. Esse efeito pode estar relacionado à interferência da quitosana e do eugenol na captação de sulfato, impactando processos metabólicos quando aplicado em altas concentrações. Ademais, a análise da atividade respiratória celular revelou que o grupo contendo quitosana e 4% de eugenol (m.m^{-1}) apresentou os maiores valores de unidade de fluorescência, indicando maior atividade metabólica em comparação ao controle e aos demais tratamentos. Dessa forma, os achados sugerem que concentrações moderadas de eugenol (1% e 4%) podem estimular a atividade da β -glicosidase e a respiração celular, enquanto concentrações mais elevadas (acima de 8%) tendem a reduzir a atividade da Arilsulfatase, o que pode influenciar a disponibilidade de sulfato e processos metabólicos no solo. Esses fatores devem ser considerados para aplicações futuras envolvendo a combinação de quitosana e eugenol. Em resumo, as formulações SC – EU5 e SA – EU98 mostraram-se promissoras como alternativas ao uso de cobre no tratamento de *X. citri*, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis.

7. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, vol. 111: 343–350, 2012.

Acosta-Martínez V., Tabatabai MA. Enzimas do ciclo do fósforo. RP Dick (Ed.), Métodos de Enzimologia do Solo, **Soil Sci. Soc. Am**, Madison, WI (2011), pp. 161 – 184.

A. Aguanell, M.L. del Pozo, C. Pérez-Martín, et al. Chitosan sulfate-lysozyme hybrid hydrogels as platforms with fine-tuned degradability and sustained inherent antibiotic and antioxidant activities. **Carbohydr Polym**, 291 (2022), Article 119611

AGRICULTURE, U.S. Department of. *Citrus: World Markets and Trade*. Washington, D.C.: **USDA**, 2024. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. Acesso em: 25 fev. 2025.

Alef, K., Nannipieri, P. (1995): *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. - **Academic Press**.

A. Bernkop-Schnurch, D. Guggi, Y. Pinter. Thiolated chitosans: Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive, permeation enhancing oral drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, 94 (1) (2004), pp. 177-186.

Ahuja, N., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2015). Eugenol-inhibited root growth in *Avena fatua* involves ROS-mediated oxidative damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 118, 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2014.11.012>

A. Sionkowska, K. Lewandowska, M. Michalska, M. Walczak. Caracterização de compósitos 3D de fibroína de seda modificados por colágeno. **J. Mol. Liq.**, 215 (2016), pp. 323 - 327, 10.1016/j.molliq.2015.12.047.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.

AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; PRADO, J. P. C.; BORGHEZAN, M.; MELO, G. W. B. de; SOARES, C. R. F. de S.; COMIN, J. J.; SIMÃO, D. G.; BRUNETTO, G. Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 270-280, Nov. 2015.

Baltierra-Trejo, E., Márquez-Benavides, L., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2015). Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, 119, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.007>

BANGYEKAN, C.; AHT-ONG, D.; SRIKULKIT, K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. **Carbohydrate Polymers**, vol. 63, p. 61–71, 2006.

BATTAGIN, T. S.; CACCALANO, M. N.; DILARRI, G.; ZAMUNER, C. F. C.; ALLEONI, N.; SALDANHA, L. L.; BACCI Jr, M.; FERREIRA, H. *Syzygium aromaticum* (clove) essential oil: An alternative for the sanitization of citrus fruit in packinghouses. **Journal**

of **Food Processing and Preservation**, v. 45, p. e15496, 2021. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15496>.

BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 1- 12, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>

Behlau, F., Scandelai, L.H.M., Silva Junior, G.J., Lanza, F.E. 2017. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. *Crop Protection* 94:185-191.

BANDICK A.K., DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.*, 31 (1999).pp. 1471-1479.

BERGER, L. R. R., STAMFORD, T. C. M., & STAMFORD, N. P. (2011). Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, 12 (4), 195 – 215.

BETTIOL, W. **Isolamento seletivo de Bacillus** In: SANHUEZA, R. M. V.; MELO, I. S. (Eds.) Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA, 2007. 141 p.

BITTANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOCHICCHIO, R.; SOFO, A.; TERZANO, R.; GATTULLO, C. E.; AMATO, M.; SCOPA, A. Root architecture and morphometric analysis of *Arabidopsis thaliana* grown in Cd/Cu/Zn-gradient agar dishes: A new screening technique for studying plant response to metals. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 91, p. 20-27, Jun. 2015.

BORGES, D. F. et al. Changes On Soil Microbiota Induced By The Use Of Commercial Products And The Incorporation Of Plant Materials. **Revista Caatinga**, v. 36, n. 2, p. 300–309, abr. 2023.

BRASIL.Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. —. **Brasília**: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

C. Tian, S. Asghar, Y. Wu, D.K. Amerigos, Z. Chen, M. Zhang, et al. N-acetyl-L-cysteine functionalized nanostructured lipid carrier for improving oral bioavailability of curcumin: Preparation, in vitro and in vivo evaluations. **Drug Delivery**, 24 (1) (2017), pp. 1605-1616.

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**, v. 131, p. 2488-2499, 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.15125>.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems — A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodc.ont.2014.12.040>

CAVALCA, L. B. Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico. **Dissertação de Mestrado**. Programa de PósGraduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada),

Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filholl (UNESP), Rio Claro – SP, 2018.

CAVALCA, L. B.; ZAMUNER, C. F. C.; SALDANHA, L. L.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; BEHLAU, F.; FERREIRA H. Hexyl gallate for the control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri*. **MicrobiologyOpen**, v. 9, p. e1104, 2020.

Champer, J.; Patel, J.; Fernando, N.; Salehi, E.; Wong, V.; Kim, J. Chitosan against cutaneous pathogens. **AMB Express**. 2013, 3, 1.

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; DE GOES, A.; DE MIRANDA, M. P.; BEATTIE, G. A. C. et al. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS One**, 13, n. 1, p. e0190563, 2018.

CUNHA, J. L. X. L. et al. Comunidade microbiana do solo cultivado com pimentão nos sistemas de plantio direto e convencional associado ao manejo de plantas daninhas. **Planta Daninha**, 32: 543–554, 2014.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1996). **Stability of myofibrillar protein-based biopackagings during storage**. *LWT - Food Science and Technology*, 29(4), 344-348.

CRUZ SILVA DA., et al. Antibacterial Activity of Nanoemulsions Based on Essential Oils Compounds Against Species of *Xanthomonas* that Cause Citrus Canker. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 1835–1846, 10 jun. 2021.

Devlin TM., Stryer L., Berg J., Tymoczko J. Bioquímica: Livro de Texto com Aplicações Clínicas (5ª ed.), **Reverté**, Barcelona (2008), p. 421.

Dias, P. P., Fernandes, M. do C. de A., Aguiar, L. A. de., Abboud, A. C. de S., & Morenz, E. F.. (2021). Atividade fungitóxica in vitro do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) e controle de *Rhizoctonia solani* em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivar maravilha quatro estações. **Summa Phytopathologica**, 47(4), 204–208. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/209982>.

DILARRI, GUILHERME. **PROTEÇÃO DE CITROS COM PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E GALATOS**. 2021. Tese de doutorado (Doutorado, Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, [S. I.], 2021.

DUARTE, A.; CARVALHO, C.; MIGUEL, M. Bioactive Compounds of Citrus as Health Promoters. Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters. **Journal of Spatial and Organizational Dynamics**. 2016b. DOI: 10.2174/97816810823941160101.

DUARTE, A.; FERNANDES, J.; BERNARDES, J.; MIGUEL, G. Citrus as a Component of the Mediterranean Diet. **Journal of Spatial and Organizational Dynamics**, v. 4, p. 289-304, 2016a.

Ekenler e Tabatabai. Atividade da β -Glucosaminidase como índice de mineralização de nitrogênio em solos. **Comun. Ciência do Solo Planta Anal.**, 35 (2004), pp. 1081 – 1094.

Engyall E. Ensaio imunoenzimático ELISA e EMIT. **Métodos Enzimol.**, 70 (1980), pp. 419 – 439

ESPOSITO C.L., KIRILOV P., ROULLIN V.G. Organogels, promising drug delivery systems: An update of state-of-the-art and recent applications. **Journal of Controlled Release**, 271 (2018), pp. 1-20.

F. Croisier, C. Jerome. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, 49 (4) (2013), pp. 780-792.

F. Liu, J. Antoniou, Y. Li, H. Majeed, R. Liang, Y. Ma, et al. Chitosan/sulfobutylether-beta-cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for tea polyphenol encapsulation. **Food Hydrocolloids**, 57 (2016), pp. 291-300.

FRANCIOLI, D. et al. DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota—Pitfalls and Solutions. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 361, 12 fev. 2021.

FAOSTAT - **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity (Acesso em: 15/01/2023).

Fang L.X.; Feng, X.Q.; Yang, S.; Fu, G.G; Wang, T.P.; Su, Z.X; **Carbohydr. Polym.** 2010, 79, 493.

ERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 1302-1318, 2018.

FUNDECITRUS. Estimativa da safra de laranja 2024/25 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro cenário em maio/2024. **Araraquara**, 2024.

Ganeshamurthy, A.M., Singh, G., Singh, N.T. (1995): Sulphur Status and Response of Rice to Sulphur on some Soils of Andaman and Nicobar Islands. - **J. Indian Soc. Soil Sci.** 43: 637-641.

GARBIM, T.H.S.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; ROMANO, E.D.B.; MARQUES, L.C.; SOUZA, M.L.V. Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill. No crescimento de plântulas e na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v.12, n.2, p.109-114, 2014.

GE, H.; LI, Y.; FU, H.; LONG, G.; LUO, L.; LI, R.; DENG, Z. Production of sweet orange somaclones tolerant to citrus canker disease by in vitro mutagenesis with EMS. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, p. 29-38, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0810-7>.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT T.S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, 2002. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic Citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of Citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

GUIMARÃES A.C, MEIRELES L.M, LEMOS M.F, GUIMARÃES M.C.C, ENDRINGER D.C, FRONZA M., SCHERER R. Atividade Antibacteriana de Terpenos e Terpenóides Presentes em Óleos Essenciais. **Moléculas**. 2019; 24(13):2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>.

Gupta, V.V.S.R., Farrell, R.E., Germida, J.J. (1993): Activity of Arylsuphatases in Saskatchewan Soils. - **Can. J. Soil Sci.** 73: 341-347.

Gan, P. G., Sam, S. T., Abdullah, M., Omar, M. F., & Tan, W. K. Water resistance and biodegradation properties of conventionally-heated and microwave-cured cross-linked cellulose nanocrystal/chitosan composite films. **Polymer Degradation and Stability**, 188, 109563, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109563>.

Hayano, K. 1973. Um método para determinação da atividade da β -glucosidase no solo. **Soil Sci. Plant Nutr.** 19 (2):130–108.

HUANG J., WANG Q., CHU L., XIA Q. Liposome-chitosan hydrogel bead delivery system for the encapsulation of linseed oil and quercetin: Preparation and in vitro characterization studies. **LWT**, 117(2020), Artigo 108615.

Joachim, H. J., Patrick, A. N. (2008): Selected Soil Enzymes: Examples of their Potential Roles in the Ecosystem. - **Afr. J. Biotechnol.** 7 (3):181-191.

JOSHI, T.; JOSHI, T.; SHARMA, P.; CHANDRA, S.; PANDE, V. Molecular docking and molecular dynamics simulation approach to screen natural compounds for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by targeting peptide deformylase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, p. 823-840, 2021.

JUNIOR, L. B.; BERTUCI, M. L.; FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M. Caracterização e biodegradação de filmes de quitosana e proteína isolada de soja incorporados com nanocristais de celulose / Characterization and biodegradation of chitosan and soy protein isolate films incorporated with cellulose nanocrystals. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 16681–16718, 2022. DOI: 10.34117/bjdv8n3-078.

Kaplan LA., Pesce AJ., Patrone U., Wassserman AV., S. Natelson. Química clínica. Técnicas de laboratório, fisiopatologia, métodos de análise, teoria, análise e correlação. 1ª ed., **Médica Panamericana**, Buenos Aires (1998), pp. 1118-1120.

Kertesz, M.A., Mirleau, P. (2004): The Role of Soil Microbes in Plant Sulphur Nutrition. - **J. Exp. Bot.** 55(404): 1939-1945.

Klose S., Bilen S., Tabatabai M., WA Dick. Enzimas do ciclo do enxofre. RP Dick (Ed.), Métodos de Enzimologia do Solo, **Soil Sci. Soc. Am**, Madison, WI (2011), pp. 125 – 159.

Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J.; **Int. J. Food Microbiol.** 2010, 144, 51.

K. Chang, W. Chen. L-Cysteine-Assisted synthesis of layered MoS₂/graphene composites with excellent electrochemical performances for lithium ion batteries. **ACS Nano**, 5 (6) (2011), pp. 4720-4728.

KWIECIEN I., KWIECIEN M. Aplicação de hidrogéis à base de polissacarídeos como sistemas de administração de probióticos. **Géis**, 4 (2), pág. 47, 2018.

LADE, B. D., DHOWLAGHAR, N., PILLAI, S. S., & PATIL, B. S. (2023). Physicochemical, mechanical, and antimicrobial properties of sodium alginate films as carriers of zein emulsion with pelargonic acid and eugenol for active food packing. **Food Packaging and Shelf Life**, 40, 101202. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2023.101202>

LI, S.; WU, F.; DUAN, Y.; SINGERMAN, A.; GUAN, Z. Citrus Greening: Management Strategies and Their Economic Impact. **HortScience**, v. 55, p. 604-612, 2020. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14696-19>

LIS A, KOWALSKA W, SIENKIEWICZ M, BANASZCZAK P. Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Phellodendron lavallei*. *Comunicações de Produtos Naturais* 12:123–126, 2017.

Marchese, A.; Barbieri, R.; Coppo, E.; Orhan, IE; Daglia, M.; Nabavi, SF; Izadi, M.; Abdollahi, M.; Nabavi, SM; Ajami, M. Atividade antimicrobiana do eugenol e óleos essenciais contendo eugenol: Um ponto de vista mecanicista. **Crítico. Rev. Microbiol.** 2017, 43, 668–689.

MATTEI, D.; GUIMARÃES, L. F.; FERREIRA, F. B. P.; SANTOS, S. R. S. R. dos; MARTIN, A. A.; GAZIM, Z. C.; DRAGUNSKI, D. C. Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes a base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd E *Rosmarinus officinalis* L. - LAMIACEAE. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 16, n. 2, p. 129-136. 2013

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Sciencw**, 69: 215–232, 1950.

Martelli-Tosi M., Masson M.M., Silva N.C., Esposto B.S., Barros T.T., Assis O.B.G., D.R. Tapia-Blácido. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydr. Polym.**, 198 (2018), pp. 61-68, 10.1016/j.carbpol.2018.06.053

McGill, W.B., Colle, C.V. (1981): Comparative Aspects of Cycling of Organic C, N, S and P through Soil Organic Matter. - **Geoderma**, 26: 267-286.

MERCK. **Eugenol Sigma-Aldrich**. 2021. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Eugenol,MDA_CHEM-818455 Acesso em: 29 out. 2024.

MESA, S. P., PEDROSO, A. T. R., & ARREBATO, M. R. (2015). Efecto de diferentes concentraciones de quitosana sobre la germinación y crecimiento de plántulas de arroz (*Oryza sativa*, L.). **Avances**, 17(4), 380-386. <http://www.ciget.pinar.cu/ojs/index.php/publicaciones/article/view/136>.

MOHAMMAD, O.; TUHIN, N.R.; HAQUE, M.E.; RUHUL, A.K.; DAFADER, N.C.; ISLAM, R.; NURNABI, M.; TONNY, W. Modification of mechanical and thermal property of chitosan-starch blend films. **Radiation Physics and Chemistry**, Manuscript. 2012. 43 p.

MORÃO, L. G. Chalconas e curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cítrico e alguns patógenos de interesse clínico. (**Tese de Doutorado**), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filholl (UNESP), Rio Claro – SP, 2018.

NADDEO, M., VIGLIOTTA, G., PELLECCIA, C. E PAPPALARDO, D. (2020). Síntese de polimacrolactonas de base biológica com porções pendentes de eugenol como novos materiais termoplásticos antimicrobianos. **Polímeros Reativos e Funcionais**, 155, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104714>.

Ndiaye, E.L., Sandeno, J.M., McGrath, D., Dick, R.P. (2000): Integrative Biological Indicators for Detecting Change in Soil Quality. - **Am J Altern Agric**. 15:26-36.

Nicholls, R.G., Roy, A.R. (1971): Arylsulfatase. - In: Boyer, P.D. (ed.) The Enzymes, Vol. 5, 3rd edn., **Academic Press**, New York.

N. Roy, N. Saha, T. Kitano, P. Saha. Biodegradação do filme de hidrogel PVP-CMC: um material de embalagem útil para alimentos. **Carboidr. Polim.**, 89 (2012), pp. 346 – 353. [10.1016/j.carbpol.2012.03.008](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.008).

NC-IUB. Comitê de nomenclatura da união internacional de bioquímica. Unidades de atividade enzimática, Recomendações. EUR. **J. Bioquímica**, 97 (1979), pp. 319 – 320.

NG, W.; SHIT, C.; EE, K.; CHAI, T. Plant Natural Products for Mitigation of Antibiotic Resistance. **Sustainable Agriculture Reviews**, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58259-3_3

OYEDEMI OAI, MABINYA VI, PIROCHENVA G, AFOLAYAN AJ. O mecanismo proposto de ação bactericida do eugenol, α -terpineol e γ -terpineno contra *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*. **Revista Africana de Biotecnologia**, 8 (7), (2009), pp. 1280 – 1286.

PARIZE, A. L. Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes de quitosana e corante natural cúrcuma. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de

Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-graduação em Química, Florianópolis, 2009.

Park, S. C.; Nah, J. W.; Park, Y. PH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. **Macromol. Res.** 2011, 19, 853.

PECORA, H. B., DILARRI, G., MENDES, C. R., and CORSO, C. R. (2018). Bioassays and coagulation studies using moringa oleifera seeds for the removal of textile dyes. **Water Sci. Technol.** 78, 1679–1692. doi: 10.2166/wst.2018.446

Pei G.G., Sam S.T., Mohd M.F.A, Omar F., and Tan W.K. "Water Resistance and Biodegradation Properties of Conventionally-heated and Microwave-cured Cross-linked Cellulose Nanocrystal/Chitosan Composite Films." **Polymer Degradation and Stability** **188**, (2021): 109563. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109563>.

POLAQUINI, C. R.; MORÃO, L. G.; NAZARÉ, A. C.; TORREZAN, G. S.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; et al. Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, p. 103031, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103031>

Rabea, E. I.; Badawy, M. E.-T.; Stevens, C. V; Smagghe, G.; Steurbaut, W.; **Biomacromolecules** 2003, 4, 1457.

RAGUPATHY, R.; JOLLEY, K. A.; ZAMUNER, C.; JONES, J. B. et al. Core-Genome Multilocus Sequence Typing for Epidemiological and Evolutionary Analyses of Phytopathogenic Xanthomonas citri. **Appl Environ Microbiol**, 89, n. 5, p. e0210122, May 31 2023.

RAMOS, M. R.; UHLMANN, A.; JUSTEN, L.; FREIRE, T. M.; PANTA, D. A. S. Uso do solo e a estacionalidade climática afetam os atributos biológicos do solo? **Agroecossistemas**, v. 12, n. 1, p. 178-200, 2020.

R. Priyadarshi, Sauraj, B. Kumar, YS Negi. Filme de quitosana incorporado com ácido cítrico e glicerol como material de embalagem ativo para prolongar a vida útil da pimenta verde. **Carboidr. Polim.**, 195 (2018), pp. 329 - 33, [10.1016/j.carbpol.2018.04.089](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089)

REHMAN, F.; KALSOOM, M.; AHMAD, S.; IQBAL, M. A.; JUNAID, S.; TARIQ, M. A.; SULTAN, A.; HAYAT, Q.; KHAN, J. Citrus Leprosis and its Impacts on Citrus Food Industry: A Review. **EC Agriculture**, v. 6, p. 34-39, 2020.

RINAUDO, Margarida, 2006. Chitin and Chitosan Properties and Applications. **Progress in Polymer Science**, 31, 603-632.

RODRIGUES, R. N.; REIS JUNIOR, F. B.; LOPES, A. A. C.; ROCHA. O. C. GUERRA, A. F.; VEIGA, A. D.; MENDES, I. C. Soil enzymatic activity under coffee cultivation with different water regimes associated to liming and intercropped Brachiaria. **Ciência Rural**, v.52, n. 3, p. 2-12, 2022.

RODRIGUES, T. C. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 193, p. 105454, jun. 2023.

ROMANO, M.R. Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese, e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expressam o gene Lhcb1*2 de ervilha 2001. 66f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências, área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de plantas) - Esalq / USP.

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

SAKKAS H, PAPADOPOULOU C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27:429–438, 2017

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, 9, p. 676-682, 2012.

SCHREUDER, W.; PLOOY, W.; ERASMUS, A.; SAVAGE, C.; BASSON, E.; LENNOX, C.; FOURIE, P. H. Postharvest fungicide treatments and cold storage control citrus black spot infections. **Crop Protection**, v. 112, p. 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.020>.

Sigma-Aldrich. **Ficha de informação de segurança de produto químico**. Versão 6.5, 2024.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRONIO, M. S.; SILVA, D. H. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **J Bacteriol**, 195, n. 1, p. 85-94, Jan 2013.

Stewart KK., Ebel RE. Medidas Químicas em Sistemas Biológicos 1ª ed. **Wiley-Interscience**, Nova York (2000), pp. 111 – 115.

Silva, C.G., Yudice E.D.C., Campini P.A.L., Rosa D.S. The performance evaluation of Eugenol and Linalool microencapsulated by PLA on their activities against pathogenic bacteria. **Materials Today Chemistry**, Volume 21, 2021, 100493, ISSN 2468-5194, <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100493>.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.37, n2, p. 155-161, 2008.
(PDF) *Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives*.

Tabatabai, M.A. Soil enzymes R.W. Weaver, J.S. Angle, P.S. Bottomley (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*, vol. 5, Soil Sci. Soc. Am, Madison, WI (1994), pp. 775-833.

TEJRAJ, M., AMINABHAVI, ASD. Hidrogéis à base de polissacarídeos como biomateriais. S. Kalia (Ed.), Polymeric hydrogels as Smart biomaterials, **Springer Series on Polymers and Comosite Materials** (2015), pp. 45-71.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia** 12. ed. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2016. 939 p.

T.M. Amiinabhavi, S.P.D., U.A. More. The role of nanotechnology and chitosan based biomaterials for tissue engineering and therapeutic delivery. J.D.B.J. Amber Jennings (Ed.), Chitosan-based biomaterials, Vol. 2, **Woodhead Publishing** (2017), pp. 1-29.

TM Amiinabhavi, SP D. Produção de hidrogéis à base de quitosana para aplicações biomédicas. JDBJ Amber Jennings (Ed.), Em biomateriais baseados em quitosana, vol. 1, **Woodhead Publishing** (2016), pp. 295-319.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol — A Review. **International Journal of Molecular Sciences Review**, v. 22, n. 3671, p. 1–13, 2021.

UMA K, HUANG X, KUMAR BA. Antifungal effect of plant extract and essential oil. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 23:233–239, 2017.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. México: Citrus anual. Attaché Report (GAIN). Dez. 2021. Disponível em: <<https://fas.usda.gov/data/mexico-citrus-annual-6>>. Acesso em: 10 de jul. 2024.

X. Liu, Y. Xu, X. Zhan, W. Xie, X. Yang, SW Cui, W. Xia. Desenvolvimento e propriedades de novos filmes biodegradáveis compostos de ácido kójico e quitosana para embalagens ativas. **Int. J. Biol. Macromol.**, 144 (2020), pp. 483-490, 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.126.

X. Zhang, Y. Gozukara, P. Sangwan, D. Gao, S. Bateman. Biodegradação de materiais poliméricos naturais à base de glúten de trigo quimicamente modificados. **Polim. Grau Facada.**, 95 (2010), pp. 2309 – 2317. 10.1016/j.polymdegradstab.2010.09.001.

XU, S. et al. Bio-converted organic wastes shape microbiota in maize rhizosphere: Localization and identification in enzyme hotspots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 184, p. 109105, set. 2023.

Wrońska N., Katir, MN. Nowak-Lange, Kadib AE., Lisowska K. Filmes biodegradáveis à base de quitosana como alternativa às embalagens plásticas. **Alimentos**, 12 (18) (2023), p. 18, 10.3390/foods12183519.

Y. He, SK Bose, W. Wang, X. Jia, H. Lu, H. Yin. O tratamento pré-colheita de oligossacarídeos de quitosana melhorou a qualidade do morango. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, 19 (8), 2018.

ZAMUNER, C. F. C.; DILARRI, G.; BONCI, L. C.; SALDANHA, L. L.; BEHLAU, F.; MARIN, T. G. S.; SASS, D. C.; BACCI, JR. M.; FERREIRA, H. A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest

decontamination of citrus fruit. **Tropical Plant Pathology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00338-9>.

ZAMORA, H.D., FERREIRA, H., PICH, A. et al. Hemicellulose additive to chitosan-based bioplastic improved the tensile strength and allowed to control the material swelling. **Polym. Bull.** 81, 9265–9285 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05152-w>

ZAMUNER, Caio Felipe Cavicchia; MARIN, Vítor Rodrigues; DILARRI, Guilherme; et al. Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker. **Frontiers in Agronomy**, v. 5, p. 1148969, 2023.

ZHANG, M.; MENG, Q. Automatic citrus canker detection from leaf images captured in field. **Pattern Recognition Letters**, v. 32, p. 2036-2046, 2011.

ZHANG, X.; FRANCIS, M. I.; DAWSON, W. O.; GRAHAM, J. H.; ORBOVIC, V.; TRIPLETT, E. W.; MOU, Z. Overexpression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v. 128, p. 91– 100, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9633-x>.

ZAMUNER, C.F.C., DILARRI, G., BONCI, L.C. et al. A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. **Trop. plant pathol.** 45, 701–709, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00338-9>

ZAMUNER, C. F. C.; MARIN, V. R.; DILARRI, G.; HYPOLITO, G. B. et al. Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker. **Frontiers in Agronomy**, 5, 2023.

ZHAO L.; FENG C.; WU K.; CHEN W.; CHEN Y.; HAO X.; WU Y. Avanços e perspectivas em substâncias biogênicas contra vírus de plantas: uma revisão. **Bioquímica e Fisiologia de Pesticidas**. 135:15–26, 2017.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 16. Capacidade inibitória dos formulados 13 e 14 fornecidos pela empresa Sta. Clara na linhagem WT306 de *Xanthomonas citri*

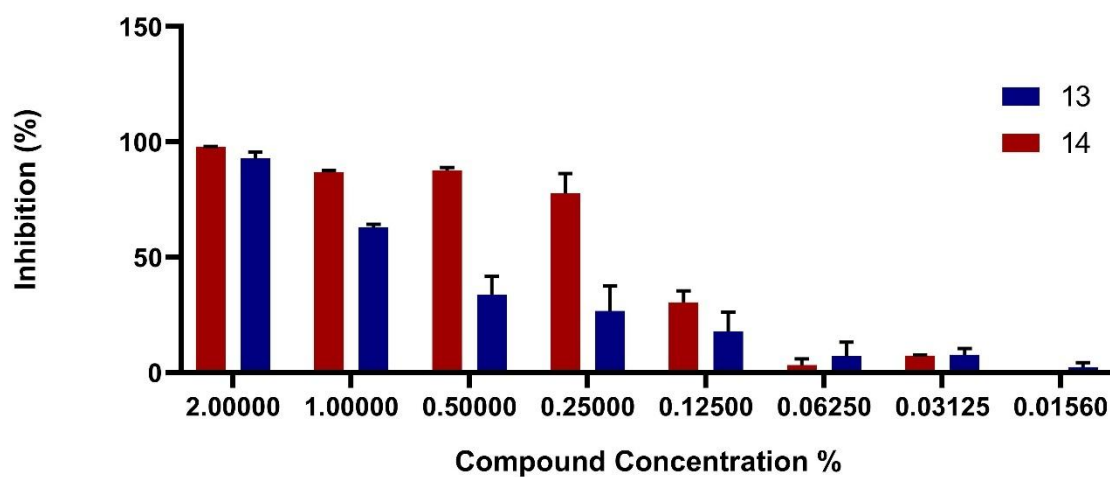


Figura 17. Capacidade inibitória dos veículos dos formulados (V1, V2 e Vmix) fornecidos pela empresa Sta. Clara na linhagem WT306 de *Xanthomonas citri*

