



INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC)
MESTRADO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

**Avaliação do potencial inibitório de óleos essenciais sobre
Phytophthora parasitica e sua conexão com as proteínas do tipo
PR-1**

MESTRANDO
MARCUS VINÍCIUS FERNANDES PRIOR

ORIENTADOR: DR. JORGE MAURÍCIO COSTA MONDEGO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Agricultura Tropical e
Subtropical. Área de concentração em Genética,
Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

CAMPINAS-SP

2026

MARCUS VINÍCIUS FERNANDES PRIOR

**Evaluation of the inhibitory potential of essential oils on *Phytophthora parasitica*
and their connection with PR-1 type proteins**

**Avaliação do potencial inibitório de óleos essenciais sobre *Phytophthora*
parasitica e sua conexão com as proteínas do tipo PR-1**

Dissertation presented to the Post-Graduation area Biotechnology,
Genetic and Plant Breeding (BGMP) at the Agronomic Institute of
Campinas as part fulfillment of the requirements for the degree of
Master in Tropical and Subtropical Agriculture.

Dissertação apresentada à área de Pós-Graduação em Biotecnologia,
Genética e Melhoramento de Plantas (BGMP) do Instituto
Agrônomo de Campinas como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego

Este trabalho corresponde à versão final da tese defendida pelo
Aluno Marcus Vinícius Fernandes Prior e orientado pelo Prof.
Dr. Jorge Maurício Costa Mondego.

CAMPINAS

2026

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária da Seção Documentação Científica do Instituto Agronômico

P958a Prior, Marcus Vinícius Fernandes
Avaliação do potencial inibitório de óleos essenciais sobre
Phytophthora parasitica e sua conexão com as proteínas do tipo PR-1 /
Marcus Vinícius Fernandes Prior. Campinas, 2026.
92 fls

Orientador: . Jorge Maurício Costa Mondego
Dissertação (Mestrado) em Agricultura Tropical e Subtropical-
Instituto Agronômico

1. Citrus. 2. *Phytophthora parasitica*. 3. Óleos essenciais
4. PR-1.5. Interação planta-patógeno. I. Mondego. Jorge Maurício
Costa . II. Título.

CDD. 634.3

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego

Orientador

Prof. Dra. Adriana Parada

Professora Titular

Prof. Dr. Leonardo Boava

Professor Titular

Prof. Dra. Raquel Boscariol

Professora Suplente

Prof. Dr. Carlos Colombo

Professor Suplente

Prof. Dra. Juliana Rolim Teramoto

Professora Suplente

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

“Existem muitas hipóteses na ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRÔNOMICO



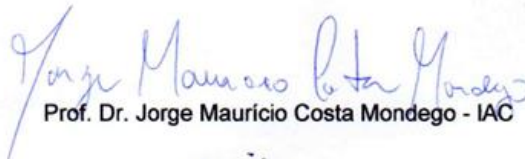
Pós-Graduação – Agricultura Tropical e Subtropical
Reconhecimento Homologado pela Portaria MEC Nº 609 de 14/03/2019 - D.O.U. 18/03/2019


ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


Aos 17 de março de 2026, às 9 horas, reuniu-se a banca examinadora homologada pelo Programa de Pós- Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, composta pelos membros abaixo listados visando à defesa de dissertação de mestrado de Marcus Vinícius Fernandes Prior, para obtenção do título de "MESTRE", conforme Processo SAA nº PRT6934/2024-43. A sessão presidida pelo Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego, orientador do aluno, foi realizada em sessão pública aberta. Iniciados os trabalhos, o candidato submeteu-se ao exame de sua dissertação, intitulada "Avaliação do potencial inibitório de óleos essenciais sobre *Phytophthora parasitica* e sua conexão com as proteínas do tipo PR-1". Terminado o exame, procedeu-se ao julgamento, cujo resultado foi o seguinte:

Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego - IAC	APROVADO <input checked="" type="checkbox"/>	REPROVADO ()
Profª. Drª. Adriana Parada Dias da Silveira - IAC	APROVADO <input checked="" type="checkbox"/>	REPROVADO ()
Prof. Dr. Leonardo Pires Boava -	APROVADO <input checked="" type="checkbox"/>	REPROVADO ()

Apurados os resultados, constatou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de "MESTRE" EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL", na área de concentração: Biotecnologia, Genética e Melhoramento de Plantas, do que, para constar, lavrou-se a presente ata, assinada pelos membros da comissão examinadora:


Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego - IAC


Profª. Drª. Adriana Parada Dias da Silveira - IAC


Prof. Dr. Leonardo Pires Boava - UNAR

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe Cristina, ao meu Pai Alberto pelo apoio incondicional à profissão que escolhi. A minha vó Raphaela pelo amor e atenção em todas as semanas que estive distante. À família Baeta, Diorema minha madrinha e Dorival meu eterno padrinho, que hoje descansa ao lado de Deus, por todos os momentos, ensinamentos compartilhados e acolhimento em momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Mondego, pela oportunidade de orientação a mim dada, pela confiança, pelos ensinamentos e aprendizados, pela paciência e tato para orientar de forma humana, pelo exemplo de pesquisador, professor e orientador no qual sempre irei me inspirar.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela oportunidade de realização do mestrado. À Capes, Fapesp e CNPq pelos recursos diretos e indiretos que contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.

Aos Professores do PPG-IAC, que compõem a área de concentração em Biotecnologia Genética e Melhoramento Vegetal e aos Professores das disciplinas cursadas pelo conhecimento compartilhado e profissionalismo em nossa formação.

Aos colegas da Pós-graduação e grupo de Pesquisa Labiplam: Marina, Natália, César, João, Pâmela, Taila, Jordana, Ivysson, Jaqueline, Mariana, Luana e Yasmin pelo convívio e aprendizado ao longo das disciplinas e experimentos.

À Prof. Flávia Patrício, pela oportunidade de realização dos experimentos envolvendo *Phytophthora parasitica* e seus cultivos, pela disponibilidade em utilizar seu laboratório e aprender com a sua vasta experiência.

À Prof. Ana Silvia Prata, pela oportunidade de realização dos experimentos com Microencapsulados e gelificação iônica, pela disponibilidade em utilizar seu laboratório e aprender técnicas que podem ser aplicadas para Biotecnologia.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo auxílio ao projeto fornecendo mudas de *citrus* para os experimentos.

Aos meus grandes amigos que me acompanham em jornadas acadêmicas e pessoais sempre me incentivando e se fazendo presente; Brenda Mistral, Gabriela Marson, Carolina e Débora Castillo, Clara Luz, Camila Carol, Alcebiades, Pietro e Guilherme Bonert.

Aos meus Preceptores de ensinamentos sobre espiritualidade e vida, Ananda (Diógenes) e Mohini (Adriana) por todos os encontros, meditações e por terem me apresentado os ensinamentos de Sri Ramana Maharshi, um dos maiores Mestres Espirituais do século XX, os ensinamentos da Colina de Fogo Sagrada, Arunachala em Tiruvannamalai no estado de Tamil Nadu, Índia.

E a todos não citados, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, agradeço de coração.

Este trabalho só foi possível graças ao apoio de vocês!

Gratidão!!!

Índice

1. LISTA DE TABELAS	8
2. LISTA DE FIGURAS	9
3. RESUMO	12
4. ABSTRACT	13
5. INTRODUÇÃO	14
5.1 Importância Econômica de <i>Phytophthora parasitica</i>	14
5.2 Ciclo de Vida de <i>Phytophthora parasitica</i>	15
5.3 β -sitosterol.....	19
5.4 Proteínas PR-1 como efetores e ligantes de compostos hidrofóbicos	21
5.5 Uso de produtos Biológicos como Insumos	23
5.6 Óleos essenciais para formulações contra <i>P. parasitica</i>	26
5.6.1 Óleo Essencial de Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	28
5.6.2 Óleo Essencial de Capim-Limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	30
5.7 Encapsulação e o uso da pectina como agente reticulante na gelificação iônica.....	30
6. JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA E OBJETIVOS	34
7. MATERIAIS E MÉTODOS	36
7.1 Cultivo de <i>Phytophthora parasitica in vitro</i> e teste de inibição com óleos essenciais.....	36
7.2 Avaliação do crescimento de <i>Phytophthora parasitica</i> na presença de B-sitosterol.....	37
7.3 Cultivo de <i>Phytophthora parasitica in vitro</i> para inoculação em <i>Citrus</i>	37
7.4 Avaliação da expressão dos genes <i>PpPR-1 in vitro</i> e <i>in vivo</i>	38
7.5 Avaliação dos sintomas das plantas de <i>citrus</i> infectadas por <i>Phytophthora parasitica</i>	39
7.6 Avaliação dos OEs em contato com <i>P. parasitica</i>	39
7.7 Microencapsulação com pectina como agente reticulante.....	40
8. RESULTADOS	40
8.1 Cultivo de <i>Phytophthora parasitica</i> e teste de inibição com óleos essenciais <i>in vitro</i>	40
8.2 Avaliação do crescimento de <i>Phytophthora parasitica</i> na presença de B-sitosterol.....	46
8.3 Cultivo de <i>Phytophthora parasitica in vitro</i> para inoculação em <i>Citrus</i>	56
8.4 Avaliação sintomática das plantas de <i>citrus</i> infectadas por <i>P. parasitica</i>	59
8.5 Avaliação da expressão dos genes <i>PpPR-1 in vivo</i>	61
8.6 Avaliação dos OEs em contato com <i>P. parasitica in vitro</i>	64
8.7 Microencapsulação de óleos essenciais por gelificação iônica com pectina e cálcio.....	72
9. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	78
10. ENSAIOS EM ANDAMENTO E PERSPECTIVAS	81
11. ANEXO	83
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eficácia de óleos essenciais contra os principais fitopatógenos	27
Tabela 2. Composto Bioativo Majoritário e Mecanismo de Ação	28
Tabela 3. Sequência de Primes qPCR utilizada no trabalho.....	39
Tabela 4. Valores encontrados para Inibição do crescimento micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> com aplicação dos Óleos Essenciais a 1%.	42
Tabela 5. Valores encontrados para Dose Letal 50 dos óleos essenciais de Capim-Limão e Orégano na inibição de <i>Phytophthora parasitica</i>	46
Tabela 6. Experimento de Infecção e Tempos de coleta de cada planta em triplicata.....	62
Tabela 7. Valores de ciclos limiars (C_i) obtidos em amostras de cDNA de <i>Phytophthora parasitica</i> (fase micelial e esporângios). Os dados representam as replicatas técnicas de amostras tratadas com óleos essenciais e controle (3 h de incubação). Valores "Não identificados" indicam ausência de amplificação em até 40 ciclos.	72
Tabela 8. Composição das Emulsões Testes 1, 2 e 3, variando concentração de pectina e de óleo para formação de esferas Pectina de Cálcio por gelificação iônica.....	73
Tabela 9. Composição das Emulsões Testes 4, 5, 6 e 7, variando a concentração de pectina e de óleo para formação de esferas Pectina de Cálcio por gelificação iônica.....	73

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>Phytophthora parasitica</i>	16
Figura 2. Modelo proposto do processo de infecção por <i>Phytophthora</i> e ação de efetores apoplásticos.	17
Figura 3. Superimposição das modelagens para as CAP-Eukaryotic de <i>P. parasitica</i> com a estrutura 5ETE (PRY1; Darwiche et al., 2017b) na região CBM. Note o maior tamanho da alça CBM nas proteínas de <i>P. parasitica</i>	22
Figura 4. Estimativa da evolução do mercado de bio defensivos no Brasil. (Adaptado de IHS Markit, 2021). 24	
Figura 5. Estimativa (%) de área tratada com bio defensivos em diferentes culturas no Brasil. Fonte: CropLife, 2021.	24
Figura 6. Mercado de Bio defensivos por vias de aplicação dos produtos.	25
Figura 7. Modelo caixa de ovos (Corona-Hernandez et al. 2013).....	33
Figura 8. Crescimento Micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> em diferentes meios (v8-ágar; v8-ágar PARPH e v8-ágar PARPH líquido.....	41
Figura 9. Crescimento Micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> , após 96 horas, em meio ágar-cenoura com óleos essenciais (1%; v/v) aplicados nas extremidades das placas. (A) Cravo (<i>Syzygium aromamicum</i>); (B) Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>); (C) Orégano (<i>Origanum vulgare</i>); (D) Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	41
Figura 10. Taxa de inibição (%) de crescimento micelial (eixo y) de <i>Phytophthora parasitica</i> frente aplicação de diferentes OEs em diferentes concentrações (Eixo X). Barras verticais representam a inibição de <i>P. parasitica</i> em porcentagem (Eixo Y). Foi usado o método de medição de diâmetro de halo micelial.	43
Figura 11. Crescimento micelial de <i>P. parasítica</i> no meio v8-sólido com óleo essencial de Orégano diluído em concentrações crescentes..	44
Figura 12. Crescimento micelial de <i>P. parasítica</i> no meio v8-sólido com óleo essencial de Capim-Limão diluído em concentrações crescentes.....	44
Figura 13. Taxa de Inibição de Crescimento (eixo y) em comparação a concentração de OE Capim Limão diluído no meio.....	45
Figura 14. Taxa de Inibição de Crescimento (eixo y) em comparação a concentração de OE Capim Limão diluído no meio.....	45
Figura 15. Crescimento Micelial em meios de diluição do B-sitosterol em A. Solução Tampão Tris-HCL 1M + 1% de BSA e B. diluído em Cloroformio.....	46
Figura 16. Crescimento Micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> em diferentes concentrações de B-sitosterol. (Colunas da esquerda para direita: C-Control; 1mg/L; 10mg/L; 20mg/L %p/v).....	47
Figura 17. Crescimento Micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> em diferentes concentrações de B-sitosterol. (C-Control; % v/v).	48
Figura 18. Crescimento Micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> na ausência de B-sitosterol. (C-Control). Observado em Microscopia Óptica com aumento de 10x.	49
Figura 19. Crescimento Micelial de <i>Phytophthora parasitica</i> na presença de B-sitosterol. (C-Control). Observado em Microscopia Óptica com aumento de 10x.	49

Figura 20. Contagem de esporângios pelo método Câmara de Neubauer, na fase limitante (água destilada autoclavada), em função de diferentes concentrações de B-sitosterol, utilizadas durante a fase de crescimento micelial (meio líquido).	50
Figura 21. Micélio e esporângios de <i>P. parasitica</i> após crescimento e posterior lavagem de meio de cultura líquido sem B-sitosterol 0,1%. Os cultivos permaneceram 7 dias no meio de cultura líquido e 10 dias na água destilada autoclavada. Microscopia óptica com aumento de 10x.....	53
Figura 22. Micélio e esporângios de <i>P. parasitica</i> após crescimento e posterior lavagem de meio de cultura líquido com B-sitosterol 0,1%. Os cultivos permaneceram 7 dias no meio de cultura líquido e 10 dias na água destilada autoclavada. Microscopia óptica com aumento de 10x.....	54
Figura 23. Micélio e esporângios de <i>P. parasitica</i> após crescimento e posterior lavagem de meio de cultura líquido sem B-sitosterol 0,1%. Os cultivos permaneceram 7 dias no meio de cultura líquido e 10 dias na água destilada autoclavada. Microscopia óptica com aumento de 10x.....	55
Figura 24. Cultivo de <i>P. parasitica</i> no método limão-cravo. (A) O cultivo contaminou por outro microrganismo. (B) O Cultivo não contaminou, entretanto o oomiceto <i>P. parasitica</i> não se desenvolveu no limão-cravo.....	56
Figura 25. Cultivo de <i>P. parasitica</i> em água destilada autoclavada, meio limitante. Experimento necessário para gerar esporângios. Os pedaços de folha <i>citrus</i> são adicionados para induzir a liberação de zoósporos no tratamento de luz.	56
Figura 26. Imagem de Microscopia óptica (10x) de <i>P. parasitica</i> em meio limitante para formação de esporângios (20 dias na água para a maior quantidade de esporângios).....	57
Figura 27. Imagem da Microscopia óptica (10x) de <i>P. parasitica</i> em meio limitante para formação de esporângios (20 dias na água para a maior quantidade de esporângios).....	57
Figura 28. Imagem da Microscopia óptica (10x) de <i>P. parasitica</i> durante liberação de zoósporos (indicados por setas verdes).	58
Figura 29. Plantas de <i>Citrus Sunki</i> e <i>Poncirus trifoliata</i> identificadas para o experimento de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> nas raízes.....	58
Figura 30. Processo de infecção das plantas de <i>Citrus Sunki</i> e <i>Poncirus trifoliata</i> por 3 horas no meio contendo zoósporos liberados por <i>P. parasitica</i>	59
Figura 31. Raízes das plantas <i>Sunki</i> não infectadas (à esquerda; controle) e infectadas (à direita).....	59
Figura 32. Raízes das plantas <i>Poncirus</i> não infectadas (à esquerda; controle) e infectadas (à direita).....	60
Figura 33. Lavagem das Raízes em Etanol e Água e Secagem em papel autoclavado para confirmação do Postulado de Koch.....	61
Figura 34. Plaqueamento da Raízes e crescimento do microrganismo para confirmação do Postulado de Koch.	61
Figura 35. Perfil do RNA em Eletroforese de Gel de Agarose 1%, referentes a extração de RNA e DNA. A extração foi realizada utilizando o protocolo com Trizol®.	62
Figura 36. Expressão Relativa das Proteínas PpPR-1A, PpPR-1B, PpPR-1C, PpPR-1D em diferentes tempos (1h, 12h, 36h, 80h, 128h) de amostragem após o período de 3h de exposição das raízes das plantas ao patógeno <i>P. parasitica</i> , em plantas de <i>Citrus Sunki</i>	63
Figura 37. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h na ausência de óleos essenciais, apenas Tween 80 0,5% (Controle) em água destilada autoclavada.	66
Figura 38. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão DL50 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada..	66

Figura 39. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão DL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada..	66
Figura 40. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão 10xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.	67
Figura 41. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão 100xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada..	68
Figura 42. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Orégano DL50 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.....	68
Figura 43. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Orégano DL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.....	69
Figura 44. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Orégano 10xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.....	69
Figura 45. Crescimento de micélio e esporângios de <i>Phytophthora parasitica</i> após 6h, com Óleo Essencial de Orégano 100xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.....	69
Figura 46. Foto das placas após tratamento com óleos essenciais. Duas placas de cima são Controles (C - apenas foi adicionado Tween 80). A primeira linha de 4 placas são os tratamentos de óleo essencial de orégano (O) da esquerda para direita aumentando a concentração de óleo essencial (O). A segunda linha de 4 placas são os tratamentos com óleo essencial de Capim-limão (CL) aumentando a concentração da esquerda para direita (CL). DL50, DL100, 10xDL100 e 100xDL100.	70
Figura 47. Gel de Agarose 1% com as Amostras das extrações de RNA de <i>Phytophthora parasitica</i> em contato com os Óleos Essenciais de Capim-Limão e Orégano 3horas e 32horas de Tratamento.	71
Figura 48. Emulsão 7 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação. Gelificação sem força suficiente para reticular a alta concentração de load.	74
Figura 49. Foto do tamanho de cápsulas produzidas com alteração nas variáveis Pressão/Vazão (A) Pressão Alta, Vazão Baixa; (B) Pressão Baixa e Vazão Alta.	75
Figura 50. Emulsão 1 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação.....	75
Figura 51. Microscopia Óptica de Fluorescência da Emulsão 1. Calcofluor branco utilizado como corante para carboidratos (pectina) e Vermelho do Nilo utilizado como corante para fase óleo. Aumento de 50x (traço – 200 µm).	75
Figura 52. Emulsão 2 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação.....	76
Figura 53. Microscopia Óptica de Fluorescência da Emulsão 2. Calcofluor branco utilizado como corante para carboidratos (pectina) e Vermelho do Nilo utilizado como corante para fase óleo. Aumento de 50x (traço – 200 µm).	76
Figura 54. Emulsão 3 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação.....	77
Figura 55. Microscopia Óptica de Fluorescência da Emulsão 3. Calcofluor branco utilizado como corante para carboidratos (pectina) e Vermelho do Nilo utilizado como corante para fase óleo. Aumento de 50x (traço – 200 µm).	77

3. RESUMO

Phytophthora spp (do grego antigo “destruidor de plantas”) são patógenos pertencentes ao grupo dos oomicetos, constituído por microrganismos eucarióticos semelhantes a fungos filamentosos, mas que são filogeneticamente relacionados a algas marrons e diatomáceas, classificados no Filo Stramenopiles. *Phytophthora spp.* afetam uma grande variedade de plantas e causa danos em ecossistemas naturais e cultivados. Patógenos desse gênero continuam sendo um grande desafio para a atividade agrícola, principalmente, devido à sua alta plasticidade genética. O gênero *Phytophthora* se distingue pela sua incapacidade de sintetizar esteróis. A capacidade de adquirir esteróis do ambiente é o que permite o crescimento e o desenvolvimento de seu ciclo de vida. *Phytophthora parasitica* produz proteínas do tipo PR-1, recentemente caracterizadas como proteínas efetoras de patogenicidade, as proteínas CAP/PR-1/SCP-TAPS se ligam ao colesterol e tem afinidade pelo ergosterol e sitosterol, há também evidências de potencial de ligação a compostos hidrofóbicos vegetais como o eugenol. O objetivo deste trabalho foi avançar no entendimento sobre os mecanismos de *Phytophthora parasitica* durante a infecção, avaliar o impacto do β -sitosterol no metabolismo do oomiceto e propor soluções para o seu biocontrole, avaliando a ação de óleos essenciais no crescimento de *Phytophthora parasitica*. Os resultados mostram que os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) apresentaram elevado potencial inibitório sobre o crescimento micelial de *Phytophthora parasitica*, com efeitos dose-dependentes e valores de DL₅₀ compatíveis com aplicações biológicas sustentáveis. A exposição do patógeno ao β -sitosterol promoveu aumento significativo no crescimento micelial, acompanhado por redução na formação de esporângios, indicando que a disponibilidade de esteróis regula o balanço entre crescimento vegetativo e reprodução assexuada. Micélios previamente expostos ao β -sitosterol apresentaram maior capacidade de formação de esporângios quando transferidos para meio limitante, evidenciando um efeito fisiológico residual desse composto sobre o ciclo de vida do oomiceto. A análise da expressão gênica por RT-qPCR revelou que os genes *PpPR-1A* a *D* não são expressos durante a fase micelial que antecede a liberação de zoósporos, tanto nos controles quanto nos tratamentos com óleos essenciais, indicando que esses compostos não interferem na regulação transcricional dessas proteínas nesse estágio do desenvolvimento. Por outro lado, durante a infecção em plantas *citrus*, observou-se indução temporal diferencial na expressão dos genes *PpPR-1*, sugerindo um possível papel dessas proteínas nos processos de colonização e interação patógeno-hospedeiro.

Palavras-chave: *Citrus*, *Phytophthora parasitica*, PR-1, Óleos essenciais, Interação planta-patógeno

4. ABSTRACT

Phytophthora spp. (from the ancient Greek "plant destroyer") are pathogens belonging to the group of oomycetes, consisting of eukaryotic microorganisms similar to filamentous fungi, but phylogenetically related to brown algae and diatoms, classified in the Phylum Stramenopiles. *Phytophthora* spp. affect a wide variety of plants and cause damage in natural and cultivated ecosystems. Pathogens of this genus continue to be a major challenge for agricultural activity, mainly due to their high genetic plasticity. The genus *Phytophthora* is distinguished by its inability to synthesize sterols. The ability to acquire sterols from the environment is what allows the growth and development of its life cycle. *Phytophthora parasitica* produces PR-1 type proteins, recently characterized as pathogenicity effector proteins. CAP/PR-1/SCP-TAPS proteins bind to cholesterol and have an affinity for ergosterol and sitosterol; there is also evidence of potential binding to hydrophobic plant compounds such as eugenol. The aim of this work was to advance the understanding of the mechanisms of *Phytophthora parasitica* during infection, evaluate the impact of β -sitosterol on the metabolism of the oomycete, and propose solutions for its biocontrol, evaluating the action of essential oils on the growth of *Phytophthora parasitica*. The results show that the essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) showed high inhibitory potential on the mycelial growth of *Phytophthora parasitica*, with dose-dependent effects and LD₅₀ values compatible with sustainable biological applications. Exposure of the pathogen to β -sitosterol promoted a significant increase in mycelial growth, accompanied by a reduction in sporangium formation, indicating that the availability of sterols regulates the balance between vegetative growth and asexual reproduction. Mycelia previously exposed to β -sitosterol showed a greater capacity for sporangium formation when transferred to a limiting medium, evidencing a residual physiological effect of this compound on the oomycete's life cycle. Gene expression analysis by RT-qPCR revealed that the *PpPR-1A* to *D* genes are not expressed during the mycelial phase associated with zoospore release, in both controls and treatments with essential oils, as these compounds do not interfere with the transcriptional regulation of these proteins at this stage of development. On the other hand, during infection in *citrus* plants, differential temporal induction of *PpPR-1* gene expression was observed, revealing a possible role for these proteins in colonization processes and pathogen-host interaction.

Keywords: *Citrus*, *Phytophthora parasitica*, PR-1, Essential oils, Plant-pathogen interaction

5. INTRODUÇÃO

5.1 Importância Econômica de *Phytophthora parasitica*

Phytophthora spp. é um gênero cosmopolita de oomicetos, vivendo em ambientes temperados, subtropicais e tropicais. Possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas herbáceas (como tabaco, tomate e cravo) e lenhosas (como *citrus* e eucalipto). *Phytophthora* spp. causa algumas das doenças transmitidas pelo solo mais graves e economicamente importantes em culturas de *citrus*. Perdas na produção de árvores e culturas ocorrem devido ao tombamento de mudas no canteiro de sementes, à podridão radicular e da coroa em viveiros, à podridão do pé, à podridão fibrosa das raízes e à podridão parda dos frutos em pomares.

A podridão do pé resulta da infecção da casca próxima ao nível do solo, produzindo lesões no tronco ou nas raízes da coroa que podem estrangular e matar a árvore. *Phytophthora* spp. também ataca e causa a decomposição de raízes fibrosas, especialmente em porta-enxertos suscetíveis em viveiros. Em pomares em produção, os danos causados pela podridão fibrosa da raiz provocam o declínio das árvores e perdas de produção. As espécies mais importantes incluem *Phytophthora parasitica*, *P. citrophthora* e *P. palmivora*.

As espécies de *Phytophthora* são responsáveis por perdas econômicas significativas para a indústria de *citrus* em diversas áreas produtivas. Na região da Califórnia, por exemplo, a podridão do pé, a podridão parda e a podridão radicular reduzem em até 46% a produção de plantas cítricas da região, resultando em perdas anuais estimadas em 12,9 milhões de dólares para o setor (Menge, 1993). Apesar de ser possível encontrar muitos artigos científicos estudando *Phytophthora* spp no estado de São Paulo e no Brasil, dados quantitativos sobre as perdas para *citrus* no estado de São Paulo não foram encontrados.

Um exemplo notável da importância de espécies do gênero *Phytophthora* spp foi o evento ocorrido em 1845, conhecido como a Grande Fome Irlandesa, ou a Grande Fome da Batata. A quebra generalizada da safra da batata devido à requeima causada por *Phytophthora infestans* devastou uma comunidade fortemente dependente da agricultura de subsistência.

Phytophthora parasitica é uma espécie reconhecida por causar podridão de raízes e caules em uma grande diversidade de hospedeiros. Até o momento, já foram registrados mais de 155 gêneros de plantas suscetíveis, distribuídos em 90 famílias botânicas distintas (Cline et al., 2008). Este patógeno apresenta um estilo de vida hemibiotrófico, iniciando a infecção com uma fase biotrófica, na qual se estabelece e se multiplica no espaço apoplástico, entre as células vivas do hospedeiro, seguida por uma fase necrotrófica, caracterizada pela indução da morte celular e subsequente colonização dos tecidos mortos (Panabières et al., 2016). Essa estratégia de infecção, aliada às características morfológicas e à alta variabilidade genética populacional da espécie, representa um desafio significativo para seu controle (Vernière et al., 2004).

É difícil estimar as perdas totais de rendimento causadas por *Phytophthora* spp, uma vez que a mesma espécie pode provocar diversas doenças em diversos cultivares. Condições ambientais, principalmente a precipitação e a umidade, podem ter um efeito drástico na incidência e severidade das

doenças (Thorold, 1955; Tollenaar, 1958). A maior parte das perdas relacionadas à *Phytophthora* spp. pode ser atribuída à podridão, seguida por cancos do caule. Um estudo realizado pela ACIAR (*Australian Centre for International Agricultural Research*; 2004) identificou uma perda anual de 10% a 30% da produção de cacau mundial pelo impacto do patógeno na planta, sendo as regiões úmidas mais severamente afetadas do que as regiões secas, em áreas muito úmidas ou em anos com elevada precipitação, esse valor pode chegar a 80%.

5.2 Ciclo de Vida de *Phytophthora parasitica*

O ciclo de vida de *Phytophthora* compreende fases assexuadas e sexuadas. A **Figura 1** ilustra o ciclo de *P. parasitica*. Suas hifas são hialinas (vítreas, incolores), não septadas e, ocasionalmente, apresentam intumescimentos. *P. parasitica* forma esporângios assexuados, zoósporos e clamidósporos. Os esporângios aderem firmemente às hifas, diferindo daqueles de *P. infestans*, os quais se desprendem com facilidade e são disseminados pelo ar. Os zoósporos originam-se dos esporângios e consistem em células desprovidas de parede celular, dotadas de dois flagelos que possibilitam sua locomoção aquática. Os clamidósporos, por sua vez, são esporos assexuados de parede espessa, multinucleados, geralmente localizados nas extremidades ou ao longo das hifas. *P. parasitica* é tipicamente heterotática, necessitando dos tipos de acasalamento A1 e A2 para a formação de oósporos (Ko, 1981). Seus oósporos geralmente têm paredes espessas e são resistentes a condições ambientais extremas. Cerca de metade das espécies de *Phytophthora* spp. são homotáticas e formam oósporos facilmente após a colonização do tecido hospedeiro, enquanto a outra metade é heterotática como *Phytophthora parasitica*, na qual são necessários isolados A1 e A2 crescendo próximos, bem como a troca de hormônios sexuais que induzem a formação de gametângios, resultando na produção de oósporos. A reprodução sexuada entre tipos opostos gera variabilidade genética, permitindo maior adaptação ao ambiente e/ou resistência a fungicidas. Os oósporos podem sobreviver por meses e provavelmente até anos no solo. Assim, esses propágulos fornecem uma fonte de inóculo de longa duração que pode permitir que os patógenos sobrevivam no ambiente fora de seus hospedeiros (Goodwin, 1997)

A geração e dispersão eficientes de esporos são fundamentais para o estabelecimento da infecção (Latijnhouwers et al., 2003). Os zoósporos são reconhecidos como os principais propágulos infecciosos responsáveis por iniciar a doença na maioria das espécies de *Phytophthora*. Ao alcançar a superfície vegetal, esses propágulos encistam-se, tornando-se imóveis, e posteriormente germinam. *P. parasitica* consegue colonizar raízes e folhas mediante a formação de um apressório derivado do tubo germinativo (Kebdani et al. 2010; Wang et al. 2011). Em seguida, desenvolvem-se hifas invasivas e estruturas do tipo haustório. Na fase final do processo, numerosos esporângios são produzidos na superfície dos tecidos infectados. Sob condições ambientais adversas, a espécie passa a formar clamidósporos a partir das hifas.

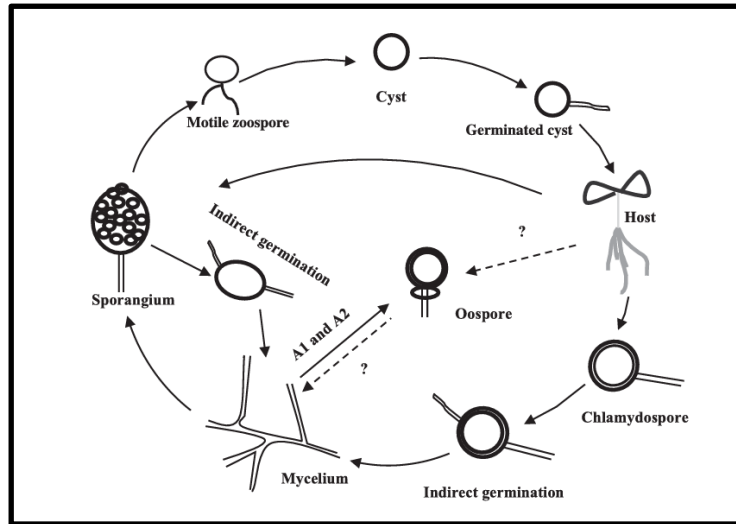


Figura 1. Ciclo de Vida de *Phytophthora parasitica*

Os clamidósporos são capazes de persistir no solo por longos períodos, atuando como importante fonte de inóculo primário em condições de campo (Van Jaarsveld, 2001). A reprodução sexuada constitui um mecanismo eficiente e relevante para a geração de variabilidade genética no patógeno, resultando em um amplo espectro de genótipos que favorecem sua adaptação a condições ambientais adversas, especialmente diante da introdução de novos genótipos de plantas hospedeiras com resistência.

Durante muitos anos, esses organismos foram tratados como fungos devido ao crescimento filamentosos. O grupo inclui mais de 85 espécies de *Phytophthora*, centenas de espécies de *Pythium* e diversos míldios, que infectam uma ampla variedade de plantas agrícolas, ornamentais e espécies nativas (Erwin & Ribeiro, 1996). Os míldios verdadeiros pertencem à ordem Peronosporales e compreendem um grupo monofilético de oomicetos fitopatogênicos biotróficos obrigatórios, atualmente distribuídos em 19 gêneros reconhecidos, incluindo *Peronospora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Hyaloperonospora*, *Bremia*, *Basidiophora*, *Paraperonospora*, *Plasmoverna*, *Perofascia*, *Sclerospora*, *Peronosclerospora*, *Sclerophthora*, *Baobabopsis*, *Graminivora*, *Viennotia*, *Novotelnova*, *Poakatesthia*, *Benua* e *Eraphthora*. A delimitação desses gêneros baseia-se na combinação de características morfológicas, como a arquitetura e ramificação dos esporangióforos, modo de liberação dos esporângios, presença e tipo de haustórios, bem como em evidências filogenéticas robustas derivadas de análises multilocus. Esses estudos mostram que os míldios compartilham uma origem evolutiva comum dentro de Peronosporales, formando um clado distinto, porém filogeneticamente próximo de outros oomicetos importantes, como *Phytophthora*, com os quais compartilham características estruturais, citológicas e moleculares fundamentais, incluindo a composição da parede celular, organização do micélio cenocítico e mecanismos de infecção. Apesar dessa proximidade, os míldios diferenciam-se principalmente pelo estilo de vida estritamente biotrófico e pela alta especificidade por hospedeiro, fatores que impulsionaram sua diversificação e especialização adaptativa dentro da ordem (Thines et al., 2023).

O ciclo de infecção de *Phytophthora spp.* inicia-se com a dispersão dos esporângios, seja pela água ou pelo ar (Judelson & Blanco, 2005). Em seguida, são liberados os zoósporos biflagelados, que se deslocam em direção aos tecidos da planta, onde reconhecem moléculas como açúcares, aminoácidos e íons presentes nos tecidos-alvo, os quais contribuem para o direcionamento da infecção (Chepsergon et al., 2020). Para se fixar ao tecido da planta hospedeira, o patógeno emprega proteínas adesivas, como mucina e jacalina, além da lectina elicitora de ligação à celulose (CBEL) e proteínas ácidas de parede celular (Gaulin et al., 2002a). Essas moléculas possibilitam que as células do patógeno se adiram firmemente à superfície vegetal, favorecendo a penetração na célula hospedeira e o desenvolvimento das estruturas infecciosas (Robold; Hardham, 2005).

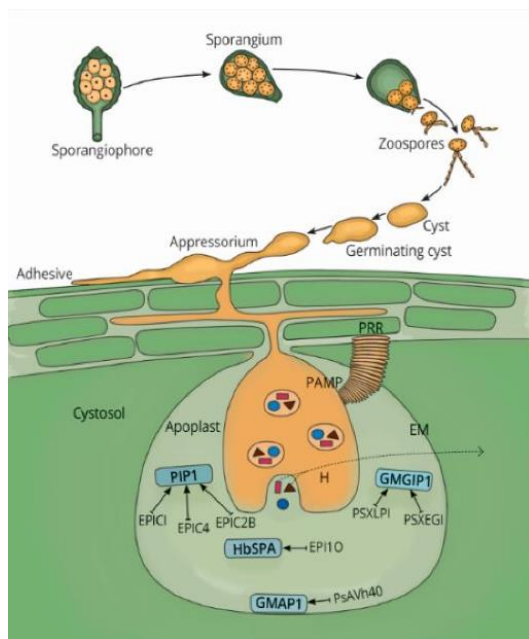


Figura 2. Modelo proposto do processo de infecção por *Phytophthora* e ação de efetores apoplásticos. Zoósporos germinam e aderem à célula vegetal, formando um apressório que penetra o hospedeiro e desenvolve hifas intercelulares e haustórios (H). Esses haustórios secretam efetores apoplásticos (azul), RxLR (roxo) e CRNs (marrom), que inibem proteases vegetais (PIP1, HbSPA, GMAP1 e GMGIP1). PAMPs de *Phytophthora* são reconhecidos por receptores PRR da planta, ativando a resposta de defesa (CHEPSERSON et al., 2020).

Uma vez aderidos à superfície da planta, os zoósporos germinam e formam um tubo germinativo que penetra no apoplasto, permitindo o estabelecimento do patógeno. Dentro do apoplasto, o oomiceto desenvolve haustórios, estruturas especializadas que atuam como sítios de absorção, possibilitando ao oomiceto captar nutrientes da planta hospedeira (Gaulin et al., 2002; Chepsergon et al., 2020; Judelson & Blanco, 2005). A colonização do apoplasto por *Phytophthora spp.* é crucial para o êxito da infecção (Van Der Hoorn & Kamoun, 2008). À medida que o patógeno progride e forma hifas intercelulares, conhecidas como vesículas de infecção, a planta ativa proteases para tentar restringir o avanço do patógeno, enquanto o oomiceto secreta inibidores capazes de neutralizar essas enzimas (Krishnan, Joseph & Roy, 2019). Um exemplo de efetor apoplástico é a proteína PE1, contendo um domínio de ligação à pectina, localizada ao redor do haustório de *P. infestans*. Esse efetor favorece o aumento da formação de haustórios, promovendo contato íntimo entre patógeno e célula hospedeira (Wang et al., 2018), o que resulta na adesão do oomiceto à parede celular. Após suprimir a resposta imune basal da planta, o oomiceto mantém-se no apoplasto, onde secreta um conjunto de proteínas conhecidas como elicinas. Depois da adesão à parede celular, ocorre a

degradação dessa barreira física por meio da ativação de enzimas de degradação da parede celular (CWDEs – *Cell Wall Degrading Enzymes*), que diminuem a complexidade estrutural da parede vegetal e permitem a penetração e colonização eficientes do patógeno no hospedeiro (Judelson & Ah-Fong, 2018).

Apesar de sua relevância, poucos estudos abordam diretamente o mecanismo de penetração. Em *Phytophthora palmivora*, condições como baixo teor de nutrientes, hidrofobicidade e características da superfície induzem a formação dos apressórios (Bircher & Hohl, 1997). Diferentemente de fungos, a diferenciação do apressório em *Phytophthora* depende de cálcio e não é estimulada por cAMP (Bircher & Hohl, 1999), indicando que vias de sinalização distintas são utilizadas em comparação aos fungos. Triagens e análises proteômicas em *P. infestans* e *P. sojae* mostraram que a formação do apressório ativa um programa genético específico (Krâmer et al., 1997; Avrova et al., 2003; Ebstrup et al., 2005; Chen et al., 2007). Genes relacionados à síntese proteica, ao metabolismo de aminoácidos e à geração de energia são induzidos nas fases iniciais de desenvolvimento do apressório e durante a infecção (Ebstrop et al., 2005; Grenville-Briggs et al., 2005). Em *P. infestans*, observa-se o acúmulo de transcritos que codificam quinases, enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs) e diversos efetores envolvidos na manipulação das células hospedeiras (Judelson et al., 2008). Um importante efector apoplástico é o CBEL (Cellulose-Binding Elicitor Lectin), purificado originalmente da parede celular de *P. parasitica*. Esse efector induz intensas respostas de defesa quando infiltrado em folhas de diferentes espécies vegetais, como tabaco e *Arabidopsis* (Mateos et al., 1997; Séjalon-Delmas et al., 1997; Khatib et al., 2004). Além disso, é essencial para a integridade da parede celular micelial e para a adesão a substratos ricos em celulose, como superfícies vegetais (Gaulin et al., 2002). CBEL apresenta uma duplicação característica de dois tipos de domínios (Tordai et al., 1999) e sua presença já foi relatada em diversas espécies de oomicetos (Links et al., 2011).

Até o momento, apenas três funções gênicas foram comprovadas como essenciais para a penetração. O silenciamento de *Pibzp1*, fator de transcrição de *P. infestans*, impede a formação do apressório (Blanco & Judelson, 2005). A supressão por RNAi de uma família de quatro genes de celulose sintase prejudica tanto a diferenciação do apressório quanto a infecção (Grenville-Briggs et al., 2008). Já o gene *PIHMP1*, que codifica uma proteína de membrana acumulada em apressórios e haustórios, é indispensável para o início da infecção (Avrova et al., 2008). A íntima ligação às células hospedeiras permite que os patógenos parasitas adquiram nutrientes facilmente; no entanto, os componentes relativamente conservados, como PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns* - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos) tornam-se estímulos para resistência mediada por receptores de reconhecimento padrões em plantas. O patógeno sendo capaz de evadir ou suprimir efetivamente a PTI (*PAMP Triggered Immunity*) por meio da secreção de um conjunto de efetores, inicia a doença na planta. Alguns efetores podem ser especificamente alvejados por proteínas resistentes em plantas, ativando a ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (Jones & Dangl, 2006).

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm se concentrado em efetores, que são fatores-chave de virulência de patógenos. Efetores são moléculas, geralmente proteínas secretadas pelo patógeno, que modulam a estrutura e as funções da célula hospedeira, favorecendo a infecção e a colonização dos tecidos (Kamoun, 2006). Esses efetores são classificados conforme sua localização de atuação: efetores apoplásticos, liberados no espaço extracelular das plantas, e efetores citoplasmáticos, que são internalizados na célula hospedeira. Diversos tipos já foram descritos (Kamoun, 2006), incluindo inibidores de enzimas, pequenas proteínas ricas em cisteína, além de duas classes principais de efetores citoplasmáticos, RXLR e CRN.

Os efetores de patogenicidade, citados anteriormente, têm o objetivo de alterar a sinalização de resistência, permitindo assim que a infecção seja bem-sucedida, pois, quando os patógenos, conseguem suprimir a PTI, ocorre também a supressão da ETI (Chisholm et al., 2006). Assim, a compreensão de como as espécies de *Phytophthora* manipulam o hospedeiro é essencial para desenvolver estratégias inovadoras e eficazes no manejo das doenças causadas pelo oomiceto (Chepsergon et al., 2020).

5.3 β -sitosterol

A investigação da via de biossíntese de esteróis em diferentes organismos mostra que um processo de três fases está envolvido, começando com a síntese de mevalonato (MVA) a partir de acetil-CoA. A via do MVA, presente e conservada em todas as espécies de *Phytophthora* (Yang, 2021), envolve então uma série de reações enzimáticas que levam à produção de dois metabólitos intermediários, farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), ambos cruciais para a transdução de sinal celular (Miziorko, 2011). Em todos os organismos sintetizadores de esteróis (ao contrário de *Phytophthora*), a via prossegue para formar 2,3-oxidosqualeno, envolvendo a esqualeno epoxidase (SQE) (Du et al., 2022). A fase final é a via pós-esqualeno, que compreende uma série de reações enzimáticas que levam à formação de vários esteróis, como colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, dependendo do organismo. Apesar da ausência de certas enzimas na via convencional de síntese de esteróis, *Phytophthora spp.* retém as enzimas 7-desidrocolesterol redutase (DHCR7) e C-5 esterol desaturase (CSD) (Wang et al., 2021), que são necessárias para a modificação de esteróis.

Embora os esteróis desempenhem função essencial na maioria dos eucariotos, alguns oomicetos, incluindo espécies de *Phytophthora*, perderam a via endógena de biossíntese de esteróis. Ainda assim, o gene *ERG3*, que codifica a enzima C-5 esterol desaturase dessa via metabólica, permanece conservado nos genomas de *Phytophthora spp.* Evidências experimentais mostram que o gene *PcERG3* é expresso em todos os estágios de desenvolvimento avaliados de *P. capsici*, apresentando níveis de expressão mais elevados nos esporângios e no micélio (Weizhen, et al., 2022).

Outros achados incluem o trabalho de Pei et al., (2024) em que foi evidenciado que SSRK1 (sterol-sensing receptor kinase 1) de *P. sojae* é capaz de detectar esteróis do hospedeiro por meio do acoplamento com elicítinas, atuando simultaneamente na sinalização e na absorção desses compostos. Os autores

verificaram que os esteróis são inicialmente captados por elicinas solúveis presentes no meio extracelular, formando complexos esterol–elicina. Esses complexos passam então a interagir com SSRK1, originando estruturas trimoleculares que desencadeiam uma série de eventos de sinalização intracelular. As ativações desses complexos resultam na indução de influxo de cálcio, na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e na reprogramação transcriptômica mediada pela atividade quinase do próprio receptor. Esses achados evidenciam que SSRK1 desempenha um papel central na percepção de esteróis do hospedeiro e na coordenação das respostas celulares subsequentes em *P. sojae* (Pei et al., 2024).

Os esteróis são uma classe de lipídeos derivados de isoprenoides, desempenham um papel crucial na sinalização intra e intercelular, bem como na manutenção da estrutura e fluidez da membrana (Yu et al., 2021). Os esteróis, como o colesterol em animais (Capel-Hattam et al., 2020), o ergosterol em fungos (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2013) e o sitoesterol em plantas (Schaller, 2003), desempenham diversas funções, incluindo a sua necessidade para a integridade da membrana celular, a regulação de processos biológicos, o papel na sinalização celular e o controle do tráfego de membranas, entre outras funções celulares. Revisões recentes (Der et al., 2024; Kazan, et al. 2017) destacaram o papel fundamental dos esteróis como atores centrais que podem governar as interações planta-patógeno e esclarecer seu papel como transdutores de sinal.

Espécies de *Phytophthora*, dentre outras da ordem Peronosporales, distinguem-se pela sua incapacidade de sintetizar esteróis (Wang et al., 2021). A capacidade de adquirir esteróis do ambiente é o que permite o crescimento e o desenvolvimento de seu ciclo de vida (Hardham et al., 2018). Espécies de *Phytophthora* exibem crescimento vegetativo e esporulação aumentados na presença de esteróis exógenos (Yousef et al., 2009). A capacidade de *Phytophthora* detectar esteróis exógenos implica a existência de uma rede intracelular de detecção de esteróis. Uma rede desse tipo foi revelada em estudos recentes conduzidos por Xue *et al.* (2021) e Wang et al. (2021) por meio de suas pesquisas sobre o patógeno da soja, *P. sojae*, e um patógeno da pimenta, *P. capsici*, respectivamente, onde foi descoberta a presença de quatro proteínas (SCPs) com domínio de detecção de esteróis (SSD).

No estudo realizado por Wang et al., (2021) foram identificados quatro genes em *P. capsici* que codificam proteínas contendo um domínio de detecção de esteróis (*sterol-sensing domain*, SSD), um domínio proteico de aproximadamente 180 aminoácidos composto por cinco hélices transmembrana e conhecido por atuar em vias de sinalização de esteróis em animais. Utilizando um sistema modificado de CRISPR/Cas9, os autores realizaram o nocaute dos quatro genes, denominados *PcSCP1* a *PcSCP4* (por *P. capsici* SSD-containing protein 1 a 4), de forma individual ou sequencial, originando linhagens mutantes simples, duplas, triplas e quádruplas (Wang et al., 2023). Os resultados revelam que o nocaute isolado de qualquer um dos quatro *PcSCPs* não foi suficiente para bloquear a sinalização mediada por esteróis. Contudo, os mutantes quádruplos, nos quais todos os *PcSCPs* foram inativados, deixaram de responder ao tratamento com esteróis durante a reprodução assexuada, ao contrário da linhagem selvagem de *P. capsici*, que apresentou produção de zoósporos sob exposição aos esteróis. Esses achados indicam que os quatro

PcSCPs desempenham papel fundamental na via de sinalização de esteróis em *P. capsici*, atuando de forma funcionalmente redundante (Wang et al., 2023). A análise transcriptômica revelou que a expressão de um subconjunto de genes é regulada por esteróis exógenos por meio da ação das proteínas *PcSCPs*. Investigações adicionais mostraram que os esteróis podem estimular a diferenciação de zoósporos via *PcSCPs*, controlando processos dependentes do citoesqueleto de actina e do tráfego de membranas. Além disso, observou-se que a patogenicidade dos mutantes quádruplos com nocaute completo foi significativamente reduzida, acompanhada pela diminuição da expressão de diversos genes relacionados à virulência, evidenciando que *PcSCPs* também contribuem para a interação patógeno-planta (Wang et al., 2023).

Além das *SCPs*, as elicinas, pequenas proteínas altamente conservadas, de aproximadamente 10 kDa, isoladas de *Phytophthora*, também foram propostas como contribuintes para o recrutamento de esteróis, ligando-se a esteróis extracelulares para permitir sua internalização (Kharel, 2021). Os esteróis se ligam à alça ômega da proteína elicina para formar um complexo elicina-esterol (Rodrigues et al., 2006). Estudos de Islam et al. (2019) mostram a localização precisa da elicina e de proteínas semelhantes à elicina na parede celular e na membrana plasmática de *P. cinnamomi*, as quais podem auxiliar no recrutamento de esteróis. Apesar da estrutura molecular conhecida e potencial função das proteínas elicinas, ainda é necessário elucidar completamente como essas proteínas, em conjunto, facilitam a aquisição de esteróis vegetais para benefício do patógeno.

5.4 Proteínas PR-1 como efetores e ligantes de compostos hidrofóbicos

Entre as proteínas relacionadas à defesa vegetal (Van Loon et al., 2006), as proteínas PR-1 fazem parte de uma superfamília conhecida como CAP (CRISP, Antigen 5, PR-1) ou SCP/TAPS (Sperm Coat Protein / Tpx, Ag5, PR-1, Sc5). Entre as características que agrupam essas proteínas é a presença de um domínio comum conservado {CGHYTQVVW[R/K]X[S/T][V/T][R/S]XGC} que inclui a quarta hélice alfa e a primeira parte da terceira folha β . Além disso, essas proteínas possuem uma conformação ‘sanduíche’ alfa- β -alfa (Cantacessi et al., 2009). Somente a partir do início da década passada surgem evidências fortes da função das proteínas SCP/TAPS. Choudhary e Schneiter (2012) verificaram que proteínas PR-1 de *S. cerevisiae* (proteínas PRY) secretam acetato de colesterol, sendo capazes de se ligarem a colesterol e ao acetato de colesterol. Após a deleção desses genes em *S. cerevisiae*, a exportação de acetato de colesterol foi praticamente abolida. Por complementação em levedura, várias proteínas dessa superfamília foram capazes de reverter a inabilidade em exportar colesterol (Gamir et al., 2016, Darwiche et al., 2017a). Verificou-se que Pry1 também tem afinidade pelo ergosterol, esterol de origem fúngica, pelo sitoesterol, um esterol encontrado em vegetais (Choudhary e Schneiter, 2012). Mutações de aminoácidos localizados numa região conhecida como motivo de ligação de caveolina (CBM, *caveolin binding motif*), indicaram que este motivo é suficiente para a ligação do esterol e/ou pequenas moléculas hidrofóbicas (Choudhary et

al., 2014; Choudhary e Schneiter, 2012). Curiosamente, mutantes depletados dos genes *Pry* se tornaram sensíveis ao eugenol (Choudhary et al., 2014; Choudhary e Schneiter, 2012). Verificou-se também que as proteínas *Pry* são capazes de se ligar ao eugenol, o que sugere fortemente que essas proteínas também participam da detoxificação de moléculas hidrofóbicas (Choudhary et al., 2014). Lin e colaboradores (2023) evidenciaram que a proteína PR-1 UmPR-1La do fungo fitopatogênico *Ustilago maydis* tem função detoxificativa contra fenólicos como o eugenol, bem como que essa detecção foi importante para elicitar a formação de pseudohifas, importantes para guiar o crescimento do fungo no interior das plantas.

Com relação a *Phytophthora parasitica*, inicialmente, verificou-se que esse oomiceto possui 26 proteínas PR-1, sendo nomeadas como PpPR-1a - PpPR-1z. Curiosamente, estas eram mais similares às CAP Bacterianas, proteínas da família CAP-SCP/TAPS presentes em bactérias (Brangulis et al., 2015) do que com as PR-1 de eucariotos. Análises genômicas mais avançadas conseguiram detectar a presença de 3 CAP eucarióticas em *P. parasitica*, que foram nomeadas PpPR-1Alfa, Beta e Gama. Avaliação de *docking* molecular, derivadas de análises da aluna de doutorado Jaqueline Bauer Uber (Projeto FAPESP (2023/04646-4) sugeriram que as proteínas CAP eukaryotic PpPR-1 tem a capacidade de se ligarem a pequenas moléculas hidrofóbicas como o dioxano, molécula com características similares ao eugenol (**Figura 3**). Além disso, Jiang et al., (2023) comprovaram que a proteína PsCAP1, similar a PpPR-1a, é uma efetora de patogenicidade de *P. sojae*, sugerindo que PpPR-1a e outros parálogos possam ser efetores de *P. parasitica*.

Análises de domínios estruturais utilizando a ferramenta InterPro revelaram que todas as proteínas PpPR-1 continham o domínio CAP bacteriano, enquanto apenas quatro proteínas — PpPR-1a, PpPR-1b, PpPR-1c e PpPR-1d — apresentavam adicionalmente o domínio PAN/APPLE. A presença desse domínio foi determinante para a seleção desses quatro genes para análises funcionais aprofundadas, uma vez que o domínio PAN/APPLE tem sido fortemente associado à modulação da resposta imune vegetal (Jiang et al., 2023).

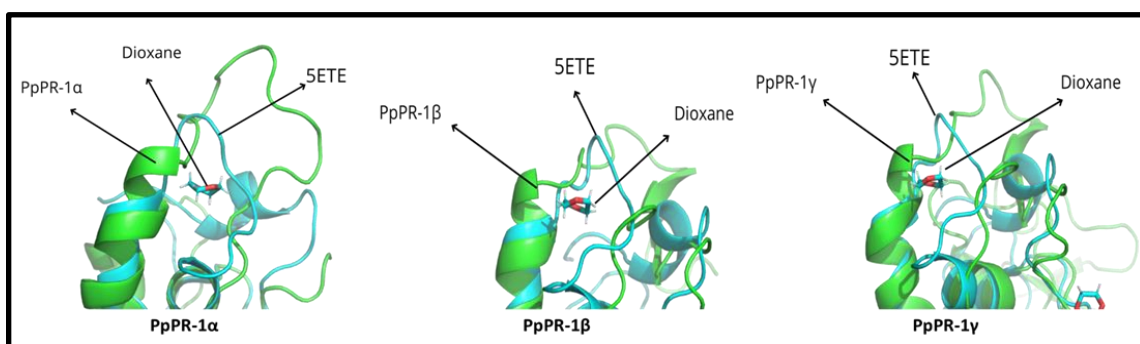


Figura 3. Superimposição das modelagens para as CAP-Eukaryotic de *P. parasitica* com a estrutura 5ETE (PRY1; Darwiche et al., 2017b) na região CBM. Note o maior tamanho da alça CBM nas proteínas de *P. parasitica*.

5.5 Uso de produtos Biológicos como Insumos

O uso de produtos biológicos tem se consolidado no Brasil e no mundo por se tratar de uma estratégia de manejo sustentável e regenerativo, que traz vários benefícios à agricultura. Os microrganismos beneficiam as plantas de diferentes formas, entre elas: promoção de crescimento, ciclagem de nutrientes e controle de pragas e doenças. Uma das grandes vantagens da utilização de bioinsumos está em conciliar os interesses dentro do cenário agrícola, visto que representam soluções inovadoras (VIDAL et al., 2020). Produtos biológicos podem ser utilizados associados ou como complementos ao manejo convencional, facilitando as operações no campo e, ainda, sendo amplamente utilizados no Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIPD) (Marchese & Filippone, 2018). Divididos em bio defensivos e semioquímicos (ou bioquímicos), os produtos biológicos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade:

(i) Inoculantes: são bioinsumos que contêm em sua formulação microrganismos com atuação favorável ao desenvolvimento vegetal, por meio da fixação de nitrogênio (N), solubilização e mineralização de fósforo (P) e potássio (K) e promoção do crescimento de plantas (Meyer et al., 2022); (ii) Biofertilizantes: são bioinsumos compostos por microrganismos benéficos que, quando aplicados via tratamento de sementes, sulco de plantio ou pulverização, favorecem o uso de nutrientes em associação com a planta, melhorando o desenvolvimento, crescimento e arranque inicial da cultura (Saritha; Tollamadugu, 2019), podendo conter compostos naturais e/ou sintéticos e com modos de ação distintos; (iii) Bio defensivos: essa classificação engloba macro e microrganismos e seus metabólitos que apresentam como ação principal o controle de pragas e doenças, reduzindo a população de insetos e/ou a pressão de sintomas de doenças no campo. Esse grupo é constituído por biofungicidas, bioinseticidas e bionematicidas, nas mais diferentes formulações, podendo conter compostos naturais e/ou sintéticos e com modos de ação distintos (ABBEY et al., 2019); (iv) Bioestimulantes ou ativadores microbiológicos: são compostos por substâncias naturais com diferentes composições e concentrações que atuam maximizando o desenvolvimento das plantas e reduzindo os efeitos de estresses bióticos e abióticos (Marrone, 2019).

A maioria dos pesticidas químicos atuais tem um único local de ação atacando a via metabólica vulnerável da praga. Dessa forma, após o uso repetido e contínuo de um pesticida químico, as pragas são capazes de desenvolver resistência ao produto, reduzindo o desempenho esperado na lavoura (Marrone, 2019). Os produtos biológicos integram um mercado em contínua expansão. Pozzebon (2023) descreve que o crescimento exponencial desse mercado decorre da adoção desses insumos em várias culturas. Embora o maior percentual de crescimento tenha ocorrido nos últimos três anos, o uso de bioinsumos vem ganhando espaço desde 2010 (Borsari, 2023). De acordo com a pesquisa de mercado da empresa *Research and Markets*, o mercado de produtos biológicos deverá atingir um faturamento de US\$ 18,5 bilhões até 2026 (ANPII, 2023). Isso representa um crescimento de 74% contra apenas 3,4% dos defensivos químicos, ressaltando que, na nova era da agricultura, conhecida como Agricultura 4.0, uma das metas a serem seguidas é a redução do uso de agrotóxicos aliada ao aporte tecnológico com sistemas inteligentes – duas ferramentas que atuarão tanto na segurança alimentar quanto na segurança energética do país (Vasconcelos,

2018). Além disso, o Brasil lidera o uso e o desenvolvimento de insumos biológicos, aplicando esse tipo de manejo em milhões de hectares. No estudo realizado pela CropLife Brasil em parceria com a S&P Global, a taxa de crescimento anual de biodefensivos no período de 2018 a 2022 foi de 61,2%, com projeção de R\$ 17 bilhões até 2030 (Medeiros, 2023) (**Figura 4**). Esse crescimento é justificado devido ao intenso desenvolvimento de produtos a campo com resultados satisfatórios no manejo de pragas e doenças. Além disso, essas biotecnologias não favorecem o surgimento de organismos resistentes aos ativos, devido aos inúmeros mecanismos de ação apresentados pelos microrganismos.

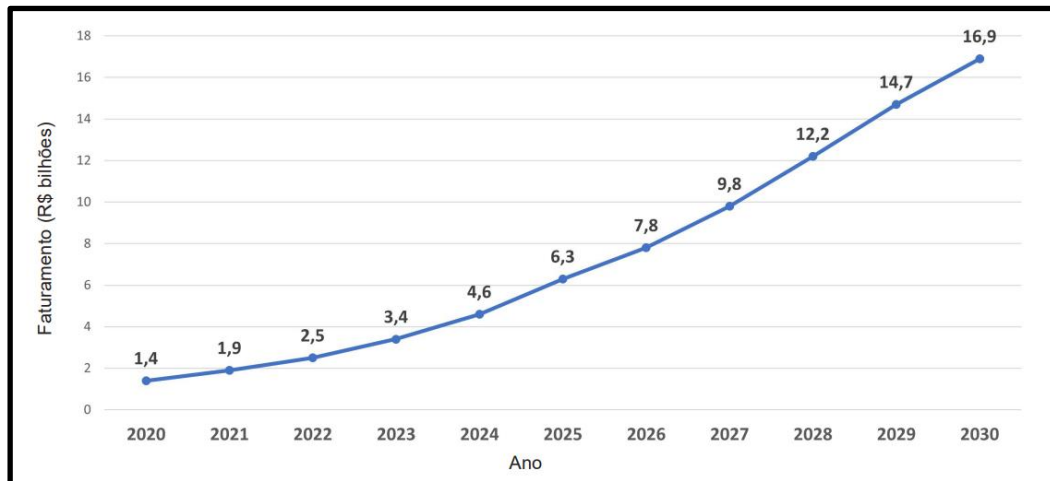


Figura 4. Estimativa da evolução do mercado de biodefensivos no Brasil. (Adaptado de IHS Markit, 2021).

As grandes culturas são as que mais impulsionam o mercado de produtos biológicos no Brasil. Segundo a pesquisa da S&P Global em colaboração com a CropLife, a soja é a cultura com a maior porcentagem de área tratada com biodefensivos (42% do total), seguida pelas culturas do algodão, com 21%, cana-de-açúcar, com 18%, e milho com 15% (**Figura 5**).

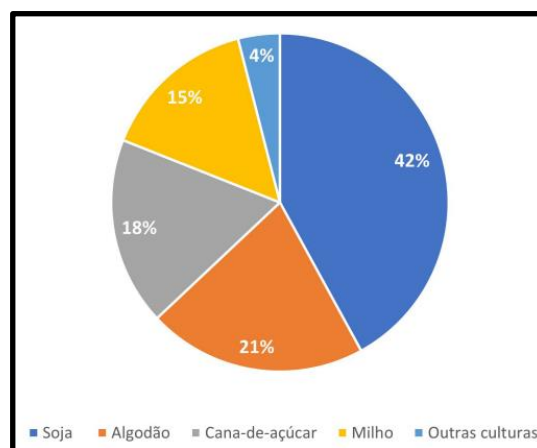


Figura 5. Estimativa (%) de área tratada com biodefensivos em diferentes culturas no Brasil. Fonte: CropLife, 2021.

No mercado de bio defensivos, a pesquisa da S&P Global em colaboração com a CropLife, identificou que dos bio defensivos comercializados 61,5% têm aplicação foliar; 14,3% têm aplicação no tratamento de sementes e 24,2% tem aplicação no solo (**Figura 6**).

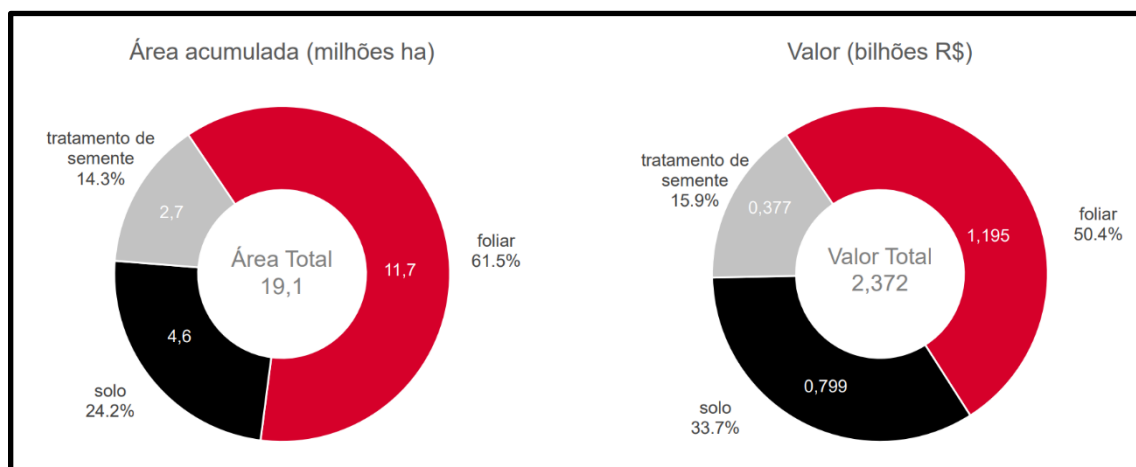


Figura 6. Mercado de Bio defensivos por vias de aplicação dos produtos. Fonte: CropLife, 2021.

Os Objetivos Globais para o Desenvolvimento Sustentável, lançados pela ONU em 2015, são uma agenda global composta por 17 objetivos interligados que promovem o equilíbrio entre o desenvolvimento econômico, inclusão social e proteção ambiental até 2030. Esses objetivos abrangem desde a erradicação da pobreza (ODS 1) até parcerias globais (ODS 17). Eles visam enfrentar desafios globais como mudanças climáticas, desigualdades sociais e degradação ambiental (ONU, 2025). Entre os objetivos globais para o desenvolvimento sustentável alinhados ao uso de bio insumos estão: ODS 2 – Fome Zero e Agricultura Sustentável; ODS 3 – Saúde e Bem-estar; ODS 6 – Água Potável e Saneamento; ODS 12 – Produção e Consumo Responsáveis; ODS 13 – Ação Contra a Mudança Global do Clima. O uso de bio insumos está diretamente ligado à sustentabilidade rural e à adoção de práticas agrícolas que maximizam a eficiência de recursos. Ferramentas biotecnológicas, como o uso de microrganismos promotores de crescimento de plantas e biocontroladores para controle de doenças e pragas agrícolas, permitem um manejo mais preciso das culturas, reduzindo desperdícios e impactos ambientais. A aplicação de bio insumos atende às exigências do mercado por produtos com menor pegada de carbono, a substituição de insumos químicos sintéticos por alternativas biológicas rastreáveis reduz a poluição ambiental, fortalece os ecossistemas locais e integra a agroindústria em círculos de bioeconomia; favorecendo a demanda por alimentos saudáveis e o tratamento responsável de resíduos.

De acordo com um estudo publicado na Nature, Scientific Reports (Medina-Romero, Y.M. 2021), apenas um número limitado de produtos naturais é usado diretamente como ingrediente ativo na proteção de cultivos, representando apenas 3,26% do mercado global de pesticidas. Estima-se que esses produtos detenham atualmente 20% do mercado em segmentos agrícolas específicos como: horticultura, produção

orgânica, pós-colheita e cultivos de alto valor agregado. Apesar da porcentagem de uso baixa atualmente no mercado, espera-se que, nos próximos anos, surjam novas soluções para esses bioinsumos a partir de pesquisas científicas, regularização de produtos e compostos e o apelo da população e produtores por práticas mais ecológicas (Medina-Romero, Y.M. 2021).

5.6 Óleos essenciais para formulações contra *P. parasitica*

Os óleos essenciais são descritos como substâncias hidrofóbicas complexas resultantes do metabolismo secundário das plantas. Eles são geralmente extraídos por meio de hidrodestilação, destilação a vapor ou pressão a frio. Esses óleos incluem uma ampla diversidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) que as plantas produzem e utilizam para defesa, comunicação intra e interespecífica, atração de polinizadores, repulsão de herbívoros, combate a fitopatógenos e na imunidade vegetal (Hijaz et al., 2016). Nas últimas décadas, os óleos essenciais têm despertado novamente grande interesse em diversas indústrias e áreas de pesquisa, como alimentos, cosméticos, farmacêutica, agronomia e medicina, devido às suas propriedades biológicas variadas, incluindo ações conservantes, antioxidantes, antifúngicas, repelentes e antibactericidas (Hijaz et al., 2016). Os compostos orgânicos voláteis desempenham um papel vital para proteger as plantas contra os ataques de patógenos e insetos (Hijaz et al., 2016). Foi verificado que a mobilidade dos patógenos dentro dos tecidos é retardada pela atividade antimicrobiana desses voláteis durante o início da infecção (Gao et al. 2005; Maffei et al., 2010). Recentemente, estudos realizados por Huong et al. (2004) e Awuchi & Morya (2023) apontam uma promissora atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra diversas bactérias, fungos e vírus. Yamasaki et al. (2007) concluíram em seu estudo que citral, citronelal e linalol liberados de folhas ásperas de limão inibiram significativamente o crescimento germinativo de hifas e esporos do crescimento germinativo de *Alternaria alternata*. Trombetta et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de três monoterpênicos comuns em óleos essenciais, acetato de linalol, mentol e timol, os quais inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Em busca dos melhores óleos essenciais para formulações ideais no combate a *Phytophthora* spp., foram encontrados quatro compostos com ações antimicrobianas: Carvacrol, Eugenol, Citronelal e Citral. Esses compostos são metabólitos secundários majoritários dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo (*Syzygium aromamicum*), canela (*Cinnamomum verum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e citronela (*Cymbopogon nardus*). O eugenol, principal componente do óleo de *Syzygium aromamicum* (cravo), tem sido utilizado como base material e molécula constituinte para a fabricação de compostos bioativos, por conta de sua estrutura particular e inúmeras aplicações encontradas nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, agrícolas e cosméticas (Islam et al., 2018; Park et al., 2006). O eugenol também demonstrou atividades antimicrobianas e antioxidantes (Hwang et al., 2020), sendo também um poderoso inseticida, eficaz em uma ampla variedade de pragas de artrópodes domésticos (De Andrade et al., 2020). O eugenol (C₁₀H₁₂O₂) é um composto aromático pertencente ao grupo dos fenóis. Contra bactérias gram-negativas, acredita-se que o eugenol atue danificando a membrana citoplasmática,

por ser uma molécula hidrofóbica, pode facilmente penetrar na membrana celular de lipopolissacarídeos e entrar no citoplasma. Uma vez presente na célula, pode causar alterações na estrutura celular, resultando no vazamento de componentes intracelulares (Daniel et al., 2009).

A **Tabela 1** condensa as principais evidências da eficácia dos óleos essenciais, comparando o tipo de óleo essencial, os componentes majoritários, patógenos alvo e os resultados encontrados. A **Tabela 2** relaciona a classe química do composto majoritário e seu mecanismo de ação no controle de patógenos alvo.

Tabela 1. Eficácia de óleos essenciais contra os principais fitopatógenos

Óleo Essencial	Componentes Químicos Majoritários	Patógenos Alvo	Cultivar	Resultados <i>in vitro/ in vivo</i>
Óleo de Melaleuca alternifolia	Terpinen-4-ol, α -Terpinene	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria alternata</i>	Morango, Tomate	Inibição de 90-100% da germinação de esporos a 0,5% (<i>in vitro</i>); redução da incidência da doença em 60% (<i>in vivo</i>). Rault, J.S. & Karuppaiyl, S.M. 2014
Óleo de Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Eugenol, β -Caryophyllene	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Banana, Papaya	Inibição completa do crescimento micelial a 1% (<i>in vitro</i>); redução de 50-70% na severidade da doença em ensaios em vasos. Lee, Y.S. et al., 2008
Óleo de Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	Timol, Carvacrol	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Alface, Feijão	Redução de 85-95% no crescimento micelial a 0,25-0,5%; diminuição de 40% na incidência da doença em ensaios em estufa. Tzortzakis, N.G. 2007.
Óleo de Capim-Limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Citral, Geraniol	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Phytophthora capsici</i>	Citrus, Pimenta	Inibição 100% da germinação de esporos a 0,75%; suprimiu o desenvolvimento de lesões em frutos. Deweer, C. et al., 2023.
Óleo de Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Carvacrol, Timol	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	Batata, Pepino	Forte inibição a 0,5-1,0%; redução de 60-80% na progressão da doença em condições de estufa. Hammer, K.A. et al., 2004.

Tabela 2. Composto Bioativo Majoritário e Mecanismo de Ação

Composto	Classe Química	Mecanismo de Ação	Patógenos Alvo	Referência
Timol	Monoterpenóide	Ruptura da Membrana, Inibição enzimática	<i>Botrytis, Fusarium</i>	Sokovic, M., et al (2008)
Carvacrol	Monoterpenóide	Formação de ROS, desintegração da membrana	<i>Aspergillus, Pythium</i>	Ultee, A., et al (1999)
Eugenol	Phenylpropanoide	Desnaturação proteica, efeito antifúngico	<i>Colletotrichum, Penicillium</i>	Marchese, A., et al. (2017)
Citronellal	Monoterpenoide aldehyde	Alteração na permeabilidade da camada bi lipídica	<i>Alternaria, Rhizoctonia</i>	Nerio, L.S. et al (2010)
1,8-Cineole	Óxido Monoterpenóide	Inibição Respiratória	<i>Phytophthora, Xanthomonas</i>	Cox, S.D., et al. (2000)

5.6.1 Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare*)

Origanum vulgare, popularmente conhecido como orégano, é uma planta herbácea perene da família Lamiaceae, amplamente utilizada em função de sua folhagem aromática e de seu óleo essencial, caracterizado principalmente pela elevada presença de carvacrol e timol, compostos fenólicos monoterpênicos responsáveis pelas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e bioativas da espécie. A espécie é originária da região do Mediterrâneo, com centros históricos de domesticação e uso tradicional concentrados na Europa Meridional, Oriente Médio e Ásia Ocidental, tendo sido posteriormente difundida para outras regiões do mundo por meio de rotas culturais, comerciais e agrícolas, especialmente ao longo do período greco-romano e da expansão árabe (Kokkini et al., 1997; Dudai et al., 2004; Lukas et al., 2015).

O óleo essencial de *O. vulgare* é altamente valorizado comercialmente devido à sua composição química rica em carvacrol (40–85%) e timol (0–20%), dependendo do quimiótipo, conferindo amplo uso nos setores alimentício, farmacêutico, cosmético e agrícola, especialmente como agente antimicrobiano natural, conservante alimentar e bioinsumo agrícola. Revisões químicas e agrônomicas indicam que o rendimento do óleo essencial varia entre 0,3% e 4,5% (m/m), enquanto a proporção relativa de carvacrol e timol é fortemente influenciada por fatores genéticos (quimiótipo), estágio fenológico da planta, condições edafoclimáticas, altitude, luminosidade e práticas de manejo agrônomico, refletindo grande plasticidade metabólica da espécie (D'Antuono et al., 2000; Kokkini et al., 2003; Lukas et al., 2015). Estudos agrônomicos comprovam que diferentes quimiótipos de *O. vulgare* estão associados a perfis químicos específicos, sendo reconhecidos principalmente os quimiótipos carvacrol, timol, sabineno hidratado e linalol, os quais determinam tanto o valor comercial quanto a aplicação tecnológica do óleo essencial. O

quimiótipo carvacrol é considerado o mais valioso do ponto de vista industrial e agrícola, em função de sua elevada bioatividade antimicrobiana, fungicida e bactericida, sendo preferencialmente explorado em formulações fitossanitárias e produtos naturais de controle biológico (Dudai et al., 2004; Lukas et al., 2015). No contexto brasileiro, levantamentos agrônômicos e revisões técnicas indicam que o cultivo comercial de *O. vulgare* concentra-se predominantemente nas regiões Sul e Sudeste, especialmente nos estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, em sistemas produtivos associados à agricultura familiar, horticultura intensiva e produção de plantas aromáticas e medicinais. Estudos conduzidos no Brasil ressaltam que as condições edafoclimáticas dessas regiões favorecem tanto o rendimento do óleo essencial quanto a elevada proporção de carvacrol, possibilitando a obtenção de matéria-prima de alta qualidade para aplicações farmacêuticas, cosméticas e agroindustriais (Blank et al., 2008; Moraes et al., 2012; Biasi & Deschamps, 2009).

O carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, é uma pequena molécula presente em muitas espécies de plantas da família Lamiaceae incluindo orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*). O carvacrol é um metabólito secundário volátil, líquido à temperatura ambiente, insolúvel em água, mas solúvel em etanol (Kalemba e Kunicka, 2003) e é o principal componente dos óleos essenciais da lamiáceas (Marchese et al., 2018; Nostro e Papalia, 2012). O carvacrol possui um único grupo hidroxila (-OH), que está próximo ao grupo metil no anel aromático. A posição única do grupo -OH no carvacrol desempenha um papel crítico em suas características químicas e biológicas (Arfa et al., 2006). O carvacrol tem sido extensivamente estudado pela sua atividade antimicrobiana na área médica, alimentícia e agrônômica, onde a maioria dos alvos são bactérias e fungos (Marchese et al., 2018; Nostro e Papalia, 2012). Quando aplicado contra bactérias, o carvacrol pode influenciar fatores de virulência, incluindo a redução da produção de toxinas e a formação de biofilme pelas bactérias. Estudos mais recentes indicaram que o carvacrol afeta a expressão genética e reduz a virulência dos microrganismos (Burt et al., 2016; Siroli et al., 2018). Contra um isolado de *Phytophthora capsici*, o carvacrol reduziu o crescimento micelial em 85% (Song et al., 2023). Exposição a vapor por 24 h de *O. vulgare* pós-inoculação reduziu a severidade do míldio em 95% (comparado ao controle); exposição contínua por 10 dias reduziu a severidade em até 98%, porém com sinais de fitotoxicidade em exposições prolongadas (Rienth et al., 2019).

5.6.2 Óleo Essencial de Capim-Limão (*Cymbopogon citratus*)

Cymbopogon citratus, popularmente conhecido no Brasil como capim-limão, ou capim-santo, é uma gramínea perene da família Poaceae amplamente utilizada pela sua folhagem aromática e pelo óleo essencial rico em citral (mistura de neral e geranial). A espécie é originária do sul da Ásia, com centros históricos de domesticação e uso tradicional no Sri Lanka e sul da Índia, tendo se difundido para outras regiões tropicais e subtropicais por via cultural e agro-comercial. O óleo essencial de *C. citratus* é valorizado comercialmente pela elevada proporção de citral (70-85% do óleo), conferindo usos industriais

em perfumaria, cosméticos, aromatizantes e farmacêuticos. Relatórios técnicos e revisões brasileiras destacam que a qualidade do óleo (teor de citral) e rendimento de extração variam conforme material genético, idade da planta, manejo e condições ambientais (Majewska, 2019). Estudos agroeconômicos e relatórios estaduais indicam que a produção comercial de capim-limão no Brasil concentra-se fundamentalmente nas regiões Sul e Sudeste, com destaque histórico para o estado do Paraná, que figura como um dos principais produtores nacionais de plantas medicinais aromáticas, incluindo *C. citratus* (Pinto et al., 2014). O composto majoritário do óleo essencial de capim-limão é o Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal; mistura de neral e geranial) é um monoterpeno acíclico com comprovadas atividades antifúngicas e antibacterianas. Estudos anteriores mostraram que citral altera vias metabólicas (rota do TCA, biossíntese de ergosterol) e a integridade de membranas em fungos filamentosos (OuYang et al., 2016; Zheng et al., 2015; Tao et al., 2014). Entretanto, mecanismos moleculares em oomicetos fitopatogênicos eram escassos e não estavam descritos até o estudo de Song et al. (2023) mostrando em particular que o citral modula genes de virulência em *Phytophthora capsici*. No estudo de Song et al. (2023) foram identificados 115 genes diferencialmente expressos em amostras fumigadas com citral, desses, 40 codificam proteínas secretadas, sendo 23 induzidos e 17 reprimidos. Os resultados encontrados pelo estudo sugerem que o citral predominantemente suprime a expressão de efetores/genes de virulência durante a infecção. Em concentrações elevadas, o citral compromete crescimento, morfologia e permeabilidade da membrana, em concentrações baixas, durante a infecção, o citral reprograma a expressão de efetores, resultando em diminuição da virulência (efetores RxLR e PcF/SCR74-like). Os autores sugerem que o citral pode atuar sobre reguladores transcricionais (TFs) ou vias regulatórias que controlam a expressão de genes de virulência. Os mecanismos moleculares exatos (receptores, ligantes e vias de sinalização) permanecem por esclarecer.

5.7 Encapsulação e o uso da pectina como agente reticulante na gelificação iônica

Pela natureza volátil dos óleos essenciais, uma possível aplicação na agricultura dependeria de uma liberação lenta e contínua para garantir os melhores resultados. De acordo com estudos envolvendo a aplicação de bactericidas, fungicidas, promotores de crescimento vegetal e indutores de resistência sistêmica, a aplicação contínua de doses em concentrações adequadas ao objetivo proposto tende a apresentar maior eficiência do que a aplicação pontual de uma dose elevada. Além de menos eficaz, a aplicação única em altas concentrações pode resultar em efeitos fitotóxicos, causando danos às cultivares, dependendo do nível de concentração utilizado (Pontes-Quero et al., 2021). Em contrapartida, utilizando técnicas para criar nanoemulsões, emulsões ou microencapsulados, é possível em muitos casos, o aumento da eficiência do princípio ativo, liberação controlada, redução da volatilização e da deriva, bem como aumento da adesão foliar. Há diversas metodologias que utilizam a microencapsulação e a nanoencapsulação; a escolha de qual metodologia e material empregado para realizar esse processo deve

ser feita com base na aplicação final para a qual o óleo essencial será encapsulado (Pontes-Quero et al., 2021).

Dentro dessa perspectiva, a escolha da pectina como material de parede para a microencapsulação de óleos essenciais com atividade inibitória sobre *Phytophthora parasitica* fundamenta-se em suas propriedades estruturais, biodegradabilidade em ambientes edáficos, elevada capacidade de formação de matrizes poliméricas e ampla disponibilidade como coproduto agroindustrial (Min et al., 2017; Nazzaro et al., 2012).

Estudos comparativos indicam que a pectina apresenta maior suscetibilidade à degradação microbiana quando comparada a outros biopolímeros amplamente empregados, tais como o alginato, resultando em taxa mais elevada de biodegradação em matrizes biológicas, o que sugere um desempenho mais favorável para aplicações em solo, promovendo uma liberação progressiva dos compostos encapsulados e reduzindo riscos de acúmulo ambiental (Lopes et al., 2024). Essa característica torna-se particularmente relevante considerando que *P. parasitica* é um patógeno habitante do solo, sendo desejável a utilização de matrizes poliméricas que apresentem persistência moderada, associada à biodegradabilidade ambiental. Ademais, a pectina apresenta custo inferior ao alginato e elevada disponibilidade no Brasil, uma vez que é obtida majoritariamente a partir de resíduos da indústria citrícola, especialmente cascas de laranja, configurando-se, portanto, como um coproduto abundante e de baixo custo (Ciriminna et al., 2015; Maran et al., 2017). A utilização desse coproduto como insumo tecnológico para formulações bioativas está alinhada aos princípios da bioeconomia circular, uma vez que favorece o aproveitamento integral da biomassa, minimiza a geração de resíduos industriais e viabiliza a obtenção de produtos de maior valor agregado, contribuindo, de forma integrada, para a sustentabilidade econômica, ambiental e social da cadeia produtiva citrícola (Ciriminna et al., 2015; Rincón et al., 2020).

A pectina é um polissacarídeo aniônico natural encontrado nas paredes celulares das plantas; sua estrutura é composta por unidades repetidas de ácido D-galacturônico ligadas por α -(1 \rightarrow 4) (Olawuyi et al., 2020) e amplamente utilizada como agente encapsulante, apresentando elevada eficiência de encapsulação, proteção contra volatilização, estabilidade físico-química e capacidade de promover a liberação gradual de compostos bioativos. Dependendo da fonte vegetal, a estrutura da pectina pode conter domínios de homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) e ramnogalacturonano II (RG-II) (Harholt et al., 2010). A diversidade na composição explica as propriedades únicas exibidas por diferentes pectinas, como seus parâmetros de gelificação, solubilidade e comportamento reológico. Além disso, a pectina pode formar redes tridimensionais de cadeias poliméricas hidrofílicas, tornando-a ideal para a preparação de hidrogéis e microencapsulados. Os géis preparados com pectina apresentam vantagens sobre outros géis de biopolímeros, como a gelatina, pela sua capacidade de formar géis rapidamente, elevada estabilidade térmica e excepcional capacidade de encapsular aromas e princípios ativos (Schrieber & Gareis, 2007). Em comparação com outros biopolímeros naturais, como amido, celulose, quitosana, colágeno, proteína e

agarose, a pectina se destaca por suas excepcionais propriedades gelificantes, permitindo a criação de hidrogéis estáveis em condições mais brandas. Além disso, a pectina oferece vantagem de gelificação e interações controláveis pela capacidade de ajuste de parâmetros quando consideradas modificações em sua estrutura denominadas grau de metoxilação e acetilação (Chen et al., 2015). Ademais, sua natureza anfifílica, com sítios polares e apolares em sua estrutura (Humerez-Flores et al., 2022), possibilita uma interação eficaz com água e óleo, tornando-a versátil para o encapsulamento de bioativos hidrofóbicos.

As pectinas de alto teor de metoxila (High Methoxy - HM), com DE (*Degree of Esterification* – Grau de Esterificação) variando de 50% ou mais, formam géis predominantemente através da coesão de forças hidrofóbicas e da formação de ligações de hidrogênio sob condições ambientais específicas. Essas condições incluem níveis de pH baixos (em torno de 2,5 a 3,5) e a presença de sólidos solúveis como sacarose (55% a 75%) para que o processo de gelificação ocorra (Lara-Espinoza et al., 2018). O Grau de Esterificação (DE) determina a faixa de pH e temperatura para a gelificação, com pectinas de grau alto, a gelificação ocorre em pH e temperatura mais elevada (Wilatz et al., 2001). A acetilação reduz a capacidade de gelificação da pectina, dificultando interações com os íons de cálcio (Wilatz et al., 2001), enquanto açúcares neutros podem tanto dificultar, quanto aumentar a coesão do gel por meio de interações hidrofóbicas (Lara-Espinoza et al., 2018). Para a composição de açúcares em pectinas com alto grau de esterificação, o efeito irá depender da geometria molecular do açúcar interagindo com as moléculas de água vizinhas (Oakenfull & Scott, 1984). Outro fator muito importante para HM pectinas é o nível de pH. O pH baixo promove a formação de gel, facilitando as interações entre as moléculas de pectina (Flutto, 2003). Os grupos carboxila nos resíduos de ácido galacturônico são menos dissociados em condições ácidas, resultando em menor repulsão eletrostática entre as cadeias de pectina. Isso permite que as cadeias gerem ligações de hidrogênio adicionais e formem uma rede de gel. Por outro lado, um pH excessivamente baixo pode causar gelificação rápida sem organização suficiente, resultando em um gel fraco e mal organizado (Flutto, 2003). Historicamente, as pectinas de baixo teor de éster (*Low Methoxy* – LM) têm servido como a melhor opção para a gelificação de produtos alimentícios. Pectinas de baixo grau de esterificação demonstram sua utilidade na formação de géis estáveis em temperatura ambiente, com baixo a moderado teor de açúcar e ácidos. As pectinas amidadas são uma subcategoria das pectinas de baixo teor de éster (LM) exibem características distintas, proporcionando uma ampla gama de propriedades funcionais na indústria, por possuírem mais grupos carboxílicos livres para interagir com os íons Ca^{2+} , essas pectinas apresentam facilidade para criar a rede de gel contínua do modelo “caixa de ovos” exemplificado na **Figura 7** (Corona-Hernandez et al., 2013). A quantidade de cálcio necessária para a gelificação é determinada pelo DE, tamanho e distribuição do ácido galacturônico não metilesterificado, bem como os parâmetros do processo (Wilatz et al., 2001; Lara-Espinoza et al., 2018). O excesso de cálcio pode causar pré-gelificação ou a formação de precipitados de pectina.

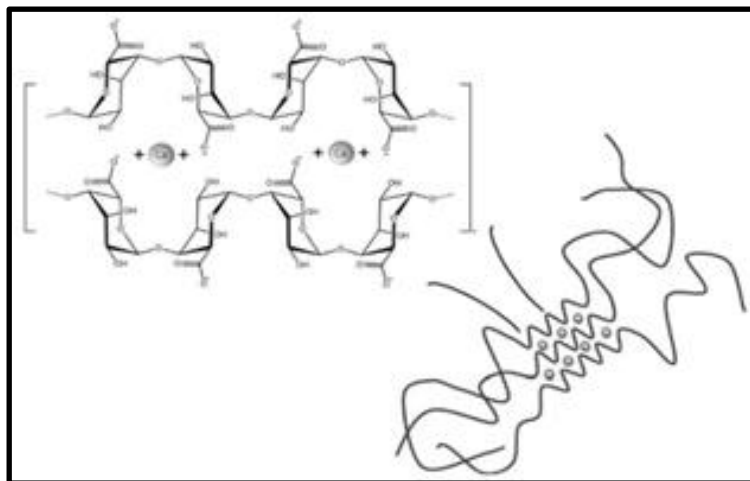


Figura 7. Modelo caixa de ovos (Corona-Hernandez et al. 2013)

De acordo com Flutto (2003) & Vriesmann et al., (2017), a presença de grupos éster, acetil ou amida na pectina interrompe a estabilização de grupos polares nas zonas de junção entre cadeias pécnicas vizinhas, resultando em formação de gel dificultada. As cadeias laterais de pectina também podem influenciar a flexibilidade da molécula, impedindo a agregação por impedimento estérico. Vários parâmetros influenciam a gelificação de pectinas com baixo teor de éster (LM), incluindo o número e a distribuição de grupos éster e amida, peso molecular, pH, força iônica e atividade da água do sistema de gelificação (Flutto, 2003). Como as ligações de cálcio só podem se formar em áreas livres de esterificação, níveis mais baixos de esterificação resultam em maior resistência do gel. A amidação da pectina aumenta o poder gelificante, promove ligações de hidrogênio e leva a géis mais resistentes e termorreversíveis com menores necessidades de cálcio. A amidação aumenta a capacidade gelificante de pectinas com baixo teor de metoxila, exigindo menos cálcio para gelificar e tornando-as menos propensas a precipitar em altos níveis de cálcio (Sharma et al., 2006). O peso molecular das pectinas com baixo teor de éster governa a gelificação, influenciando o número de zonas de conexão necessárias (Flutto, 2003). Pectinas com pesos moleculares mais altos têm mais zonas de junção, levando a uma gelificação mais rápida. O comprimento da cadeia de pectina está diretamente relacionado ao seu peso molecular, criando maior número de zonas de junção e resultando em uma formação de gel mais forte (Begum et al., 2021).

O pH da solução de pectina influencia a textura do gel, bem como as necessidades de cálcio. Estudos sobre as propriedades do gel pectina LM (Lootens et al., 2003) revelaram que a redução para pH 3 enfraqueceu o gel induzido por Ca^{2+} para pectina não amidada, mas o fortaleceu para pectina amidada. Curiosamente, a pectina LM pode formar géis mesmo em um pH baixo sem Ca^{2+} (Gilsenan et al., 2000). Uma transição conformacional ocorre que induz a agregação e a gelificação da pectina quando o pH é mais baixo. Além disso, a gelificação da pectina LM é favorecida em pH alto, pois as pontes de Ca^{2+} requerem um número adequado de grupos carboxílicos dissociados (Begum et al., 2021).

As plantas também podem responder a padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como oligogalacturonídeos (OGs), liberados pela própria planta após ferimento direto ou infecção por patógenos

(Hou et al., 2019). OGs de alto grau de polimerização (DP), contendo de 10 a 15 resíduos de ácido galacturônico (OGDP10-15), estão entre os DAMPs mais extensivamente estudados capazes de desencadear a imunidade vegetal (Meresá et al., 2024). Esses oligômeros são liberados da degradação parcial do homogalacturonano péctico (HG), um componente primário da parede celular e da lamela média da planta, por meio da atividade de pectina/pectato liases e poligalacturonases microbianas (Li et al., 2024).

Essas enzimas pectinolíticas, comumente produzidas por patógenos necrotróficos, são fundamentais para liberar nutrientes da parede celular e, assim, facilitar o processo de infecção (Zhang et al., 2013). A interação entre microrganismos benéficos, como, *Bacillus velezensis* e sua planta hospedeira é caracterizada por uma complexa comunicação química que envolve a troca de moléculas sinalizadoras difusíveis, incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e fitormônios (Venturi et al., 2016). Considerando que muitos desses compostos foram identificados em exsudatos radiculares de plantas, muito ainda há muito a ser descoberto sobre a natureza e a diversidade das moléculas que moldam e influenciam essa interação. Nesse contexto, a percepção dos polímeros da parede celular vegetal desempenha um papel fundamental que pode impactar a aptidão de microrganismos benéficos na rizosfera (Beauregard et al., 2013). Recentemente, o estudo de Boubsi et al. (2023) demonstrou que *Bacillus velezensis* modula características chave de desenvolvimento em resposta à alta glicose. Especificamente, a bactéria estimula a síntese de surfactina, aumenta a formação de biofilme e acelera sua dinâmica de esporulação (Boubsi et al., 2023). Além disso, esse aumento na aptidão de *Bacillus velezensis* mediado por HG e facilitado por duas enzimas degradadoras de HG, nomeadamente PelA e PelB, constituem seu arsenal muito limitado de enzimas degradadoras de pectina (Boubsi et al., 2023).

6. JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA E OBJETIVOS

O gênero *Phytophthora* se distingue por sua incapacidade de sintetizar esteróis. A capacidade de adquirir esteróis do ambiente é o que permite o crescimento e o desenvolvimento de seu ciclo de vida. As proteínas PR-1, envolvidas em mecanismos de defesa e patogenicidade, fazem parte de uma superfamília conhecida como CAP ou SCP/TAPS. Evidências robustas da função das proteínas SCP/TAPS sugerem que proteínas PR-1 de *Saccharomyces cerevisiae* (proteínas PRY) secretam e transportam acetato de colesterol, sendo capazes de se ligar a colesterol e ao acetato de colesterol, apresentando também afinidade pelo ergosterol, esterol de origem fúngica, pelo sitoesterol, esterol encontrado em vegetais. Curiosamente, mutantes depletados dos genes *PRY* se tornaram sensíveis ao eugenol. Verificou-se também que as proteínas Pry são capazes de se ligar ao eugenol, o que sugere fortemente que essas proteínas também participam da detoxificação de moléculas hidrofóbicas. Hoje, o uso de compostos naturais, como os óleos essenciais, na área agrícola ocupa posição de liderança em estudos de grandes centros e simboliza uma alternativa às classes químicas utilizadas em biocontrole. Esses óleos incluem uma ampla diversidade de

compostos orgânicos voláteis (COVs) que as plantas produzem e utilizam para comunicação intra e interespecífica. O objetivo deste trabalho foi avançar no entendimento dos mecanismos de *Phytophthora parasitica* durante a infecção, avaliar o impacto do sitoesterol no metabolismo do oomiceto e propor soluções para o seu biocontrole, avaliando-se a ação de óleos essenciais no crescimento desse oomiceto.

Tendo em vista que:

- (i) *Phytophthora parasitica* é um patógeno auxotrófico para esterol, a capacidade de adquirir esteróis do ambiente é o que permite o seu crescimento e desenvolvimento;
- (ii) *Phytophthora parasitica* produz proteínas do tipo PR-1, recentemente caracterizadas como proteínas efetoras de patogenicidade;
- (iii) Proteínas CAP/PR-1/SCP-TAPS se ligam a esteróis e têm afinidade pelo ergosterol e sitosterol.
- (iv) *Phytophthora parasitica* é suscetível à ação de óleos essenciais;
- (v) Proteínas do tipo CAP/PR-1/SCP-TAPS foram recentemente descritas como proteínas com potencial de ligação a compostos hidrofóbicos vegetais como o eugenol;

Hipóteses centrais:

1. Os óleos essenciais microencapsulados tem potencial de inibir a infecção de *Phytophthora parasitica in vivo*;
2. Os genes PpPR-1 estão envolvidos no processo de infecção por *Phytophthora parasitica* e na detoxificação de compostos hidrofóbicos;

Objetivos específicos:

- a) Testar o uso de óleos essenciais na inibição do crescimento de *P. parasitica in vitro*;
- b) Avaliar como o B-sitosterol interfere no metabolismo de *P. parasitica*;
- c) Cultivar micélios de *P. parasitica* na presença de óleos essenciais e quantificar, por RT-qPCR, a expressão dos genes *PpPR-1* de *P. parasitica*;
- d) Quantificar por RT-qPCR a expressão dos genes *PpPR-1* de *P. parasitica* em plantas de *citrus* durante infecção;
- e) Quantificar por RT-qPCR a expressão dos genes *PpPR-1* de *P. parasitica* suplementados com B-sitosterol em plantas *citrus* durante a infecção;
- f) Padronizar a encapsulação de óleos essenciais para aplicação em ensaios *in vivo* durante a infecção de *P. parasitica* em plantas. Os resultados deste tópico constam no anexo da tese.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Cultivo de *Phytophthora parasitica in vitro* e teste de inibição com óleos essenciais

Amostras de esporângios de *P. parasitica* isolado IAC 01/95.1, coletado em plantas de *citrus* infectadas, serão cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Feichtenberger do Instituto Biológico de Sorocaba. Os esporângios foram plaqueados em meio de cultura ágar V8 para o seu crescimento e produção de hifas. Amostras das hifas foram retiradas das placas para extração de DNA e confirmação de *P. parasitica* por PCR. Após a confirmação, *P. parasitica* foi repicado em placas de Petri com meio V8 e 4 poços contendo aplicações de óleos essenciais nos poços. Foram montadas placas em triplicata para cada concentração de óleos essenciais: eugenol, carvacrol, citronelal e citral (1%), mais 5 placas como controle negativo. Este experimento foi realizado utilizando os óleos essenciais fornecidos pela empresa doTERRA BRASIL LTDA, que possui os dados cromatográficos dos frascos de cada óleo essencial disponível para pesquisa e laudo-técnico de seus constituintes através do seu website (<https://sourcetoyou.com/pt/you>).

No segundo teste de inibição, as repicagens foram também realizadas em triplicatas contendo uma diluição seriada dos óleos essenciais que tiveram o melhor resultado de inibição no teste anterior. Através da medição do diâmetro de crescimento do micélio após 10 dias, foi realizada a curva de taxa de inibição (eixo y) e concentração de óleo essencial (eixo x) com o objetivo de determinar a Dose Letal 50 (DL50-dose suficiente para inibir o crescimento de 50% do microrganismo).

Após a determinação dos valores de Dose Letal 50 para o Óleo Essencial de Capim-Limão e de Orégano, foi realizado um experimento para verificar os mecanismos de ação dos óleos essenciais e seus efeitos no micélio e esporângios de *Phytophthora spp.* Para isso placas com o cultivo em meio v8-ágar foram repicadas com auxílio de um furador de 7mm, para um meio v8-líquido por 7 dias para crescimento micelial. Após 7 dias, o micélio foi lavado com água destilada autoclavada e deixados por mais 7 dias somente na água. O experimento se iniciou ao adicionar as concentrações de óleo essencial DL50, DL100, 10xDL100 e 100xDL100. Imagens de microscopia óptica revelaram a integridade do micélio *P. parasitica* após o contato com as diferentes concentrações dos dois Óleos Essenciais.

7.2 Avaliação do crescimento de *Phytophthora parasitica* na presença de B-sitosterol

O primeiro teste a ser realizado foi feito para verificar qual diluição de B-sitosterol é melhor assimilada pelo oomiceto. Para isso foi realizado a diluição do B-sitosterol em clorofórmio e em Solução Tris-HCl 1M pH 7. As placas contendo 1mg/ml de B-sitosterol com o uso dos dois diferentes solventes foram avaliadas quanto a integridade do crescimento do microrganismo. Encontrado o melhor solvente para essa diluição, o micélio de *Phytophthora parasitica* foram repicados para meio de cultura contendo 1% 7% e 14% de B-sitosterol, por cerca de 7 dias de crescimento ou até alcançar a borda da placa. O padrão de crescimento micelial foi observado ao longo dos dias. O segundo teste também ocorrerá no meio sólido

porém dessa vez com as diluições de B-sitosterol de 1 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L. Com base nos resultados desses experimentos e nos dados encontrados na literatura foi determinado as melhores concentrações de B-sitosterol para ser testada durante o crescimento micelial, meio de cultura V8 líquido. O micélio que receberam a concentração de 0,01%, 0,1% e 1% de B-sitosterol foram comparados com os que não receberam B-sitosterol. A diluição de B-sitosterol em Solução Tris-HCL 1M pH 7 foi preparada da seguinte forma: sob agitação constante e 40 °C o B-sitosterol foi diluído em etanol puro 250 mg/ml ou 0,25 g/mL. 40 microlitros dessa solução foram diluídos em 29,96 mL (0,333mg/mL) de uma Solução Tris-HCL 1 M ph 7 para formar a solução de aplicação. BSA 1% foi adicionado à solução. A solução de aplicação foi diluída em 50 mL de meio de forma a obter as concentrações finais de B-sitosterol: 1 mg/L; 10mg/L; 20mg/L (1mg/L – foi adicionado 0,145mL da solução de aplicação, 10mg/L – foi adicionado 1,454 mL da solução de aplicação, 20 mg/L – foi adicionado 3 mL da solução de aplicação). Fotografias de microscopia óptica revelaram a integridade e maturação dos esporângios na presença e ausência de B-sitosterol.

7.3 Cultivo de *Phytophthora parasitica in vitro* para inoculação em *Citrus*

Com o objetivo de inocular *P. parasitica* em plantas de *Citrus* foi necessário primeiramente induzir os esporângios das hifas de *P. parasitica* a produzirem zoósporos. Isso foi realizado gerando uma condição estressante para *P. parasitica* após ter sido inoculado em um meio abundante de nutrientes. Esses experimentos foram realizados com apoio da Dra. Flavia Patrício (Instituto Biológico, Campinas) e de membros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC, Cordeirópolis). Amostras de hifas de *P. parasitica* foram inoculadas em meio PARPH modificado, originalmente descrito por Kannwischer & Mitchell (1978). Um meio ágar-cenoura foi primeiramente preparado e então deixado esfriar após autoclavagem, o ágar foi mantido a 45°C usando um banho-maria. Quatro antibióticos e fungicidas em PARPH (Pimaricina 10 mg/L; Ampicilina 100 mg/L; Rifamicina 10 mg/L, PCNB 75-100mg/L, himexazole 50 mg/L) foram adicionados ao meio. Os cultivos de *P. parasitica* em meio PARPH foram mantidos a 20°C- 25°C para crescimento e posteriormente foram cortados em círculo com o auxílio de um furador de cortiça autoclavado previamente. Os círculos de meio PARPH com cultivos de *P. parasitica* foram inseridos em uma agulha um a um para posterior inserção em limão siciliano (meio abundante de nutrientes) previamente perfurado no diâmetro necessário para caber cerca de 10 círculos de meio de cultura. Após 15 dias, o limão siciliano foi cortado ao meio e as hifas de *P. parasitica* foram inoculadas em placas em meio ágar-cenoura formando apenas uma fina camada de nutrientes (meio limitante/estressante). As placas foram mantidas na temperatura de 26°C e foi testado o estresse por frio a 4°C ou por saturação de luz. O método com maior formação de zoósporos foi aplicado para o restante do trabalho. Para visualizar os zoósporos sendo liberados pelos esporângios foi utilizado o microscópio e a contagem por câmera Neubauer. À medida que os zoósporos foram visualizados na concentração de 1×10^6 foi então adicionado água autoclavada aos meios de cultura para preparação dos inóculos das plantas. Processo de infecção: retirar as raízes dos tubetes e

limpar a terra, mergulhar as raízes no inóculo e deixar por 3 horas, retornar as raízes para a terra dentro do tubete; derramar o inóculo na superfície do solo.

7.4 Avaliação da expressão dos genes *PpPR-1* *in vitro* e *in vivo*

O RNA total do micélio de *P. parasitica* e dos tecidos vegetais provenientes do experimento de infecção foi extraído utilizando o kit *Power Plant RNA isolation* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante. Para eliminar eventuais contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I (Qual?). A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria no equipamento L-Quant 2 (LoccusBiotecnologia), enquanto a integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (tampão TAE 1x). O RNA foi armazenado a -80 °C até o processamento. Para a síntese do cDNA, utilizou-se aproximadamente 1 µg de RNA total, iniciadores oligo-dT e a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Os *primers* para a amplificação dos genes *PpPR-1* foram desenhados a partir das sequências anotadas anteriormente utilizando as ferramentas de desenho de primers GeneRunner (<http://www.generunner.net>) e primer3 (<https://primer3.org>). Foi dada preferência para os genes *PpPR-1* CAP-Eukaryotic (Alfa, Beta e Gama) e os genes *PAN/PpPR-1* (*a*, *b*, *c*, *d*) cujo homólogo *PsCAP1* de *P. sojae* é um efetor de patogenicidade (Jiang et al., 2023). A análise da abundância relativa de transcritos foi realizada por RT-qPCR utilizando o equipamento 7500 Fast (Applied Biosystems). As reações foram preparadas com o reagente SYBR Green Master Mix (Bio-Rad, EUA) e cDNA diluído 1:10. As reações foram conduzidas em triplicata técnica, sob as seguintes condições de ciclagem: 2 minutos a 95°C e depois 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, seguidos de anelamento a 60 °C durante 30 segundos. Ao final das amplificações, foi gerada uma curva de dissociação (*melting curve*) para confirmar a especificidade dos amplicons. Controles negativos (NTC - *No Template Control*) foram incluídos em todas as corridas. O ciclo limiar (*Cycle Threshold* - C_t) foi determinado automaticamente pelo equipamento e a expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O gene da ubiquitina (*UBC*) de *P. parasitica* foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados (Maximo et al., 2019).

Tabela 3. Sequência de Primes qPCR utilizada no trabalho.

Primes	Sequência Forward	Sequência Reverse
UBC	AGTCGGGCCGTTGGTTGTTT	GAAACCACGCGGCGTACAAC
PpPR-1A	GCGACTTCTACGGAAACGAC	CAGTGCGTGCATTTTGAATC
PpPR-1B	TAGTTCCAGTAGCGGGCTCT	ATAGTGAGCGCACCAAGACC
PpPR-1C	TTGTGCCAATGACGCTACCT	AGTGCCGTAGTTTGTGCTCT
PpPR-1D	CAACTCGTACCGTGCTCAGT	GATCCCTCGTGTGCCATGAT

7.5 Avaliação dos sintomas das plantas de *citrus* infectadas por *Phytophthora parasitica*.

As plantas foram analisadas após 5 a 6 semanas, observando-se as folhas superiores e anotando o número de plantas por classe de sintomas (1 a 4) segundo escala gráfica (Schmitthenner, 1994):

1= sem sintomas;

2= leve clorose e leve clareamento de nervuras;

3= evidente clareamento de folhas e/ou nervuras.

4= folhas encarquilhadas, com necrose, clareamento sistêmico e/ou queda.

As medições ocorreram 50 dias após o término.

7.6 Avaliação dos OEs em contato com *P. parasitica*.

Para avaliar a integridade do micélio mais esporângios de *P. parasitica* em contato com os óleos essenciais, foram definidas 4 concentrações de OE a ser aplicadas nas placas: DL50, DL100, 10XDL100 e 100xDL100. As imagens de Microscopia Óptica mostram a integridade do micélio e esporângios frente a diferentes concentrações dos OEs. Para avaliar a interação os óleos essenciais de Orégano e Capim-Limão na concentração de 10xDoseLetal100 + Tween80 0.5% foram aplicados em placas de Petri contendo o micélio e esporângios de *P. parasitica*. As placas foram mantidas em agitação, foram feitos triplicatas e controles em que só foi aplicado Tween 80. As placas foram congeladas em nitrogênio líquido após 3 horas de tratamento e 36 horas de tratamento. O RNA das amostras foi extraído utilizando o mesmo protocolo das extrações da raiz. A expressão dos genes PpPR1-a, b, c e d foram avaliadas para o micélio + esporângios (Controle) e os Tratamentos com óleos essenciais.

7.7 Microencapsulação com pectina como agente reticulante.

Os testes para encapsulação dos óleos essenciais com pectina foram realizados utilizando como base o estudo de Sriamornsak et al (2004). Foram definidas 3 proporções de emulsões de óleo em água, alterando a composição de pectina para testar a estabilidade da emulsão e o comportamento de reticulação. A partir desses resultados foram testadas mais 4 emulsões com variações de composição do melhor resultado das 3 primeiras emulsões. As composições de cada Emulsão testada se encontram no apêndice.

As emulsões foram feitas com o auxílio de um Dispensor ultra turrax T10 e agitadores magnéticos. Em um béquer foi adicionado primeiramente a água e a pectina, sob agitação constante por no mínimo 1 hora. Posteriormente foi adicionado a fração óleo para gerar a emulsão. Após 1 hora em agitação, foram retiradas alíquotas de 20 mL para o teste de estabilidade em provetas. A emulsão então foi bombeada, através de uma mangueira, por uma bomba dosadora peristáltica até chegar no bico gotejador. Com auxílio de pressão de ar ou não e em um bico de 7mm, a emulsão foi gotejada em um banho de cloreto de cálcio 1M para reticulação.

8. RESULTADOS

8.1 Cultivo de *Phytophthora parasitica* e teste de inibição com óleos essenciais *in vitro*.

Isolados de *Phytophthora parasitica* recebidas do Prof. Dr. Eduardo Feichtenberger do Instituto Biológico de Sorocaba foram cultivadas em meio V8 sólido. A **Figura 8** mostra os principais meios utilizados para repiques e conservação do micélio de *Phytophthora parasitica* ao longo do projeto. A primeira placa da esquerda para a direita, é o meio-V8 sólido utilizado como base para crescimento micelial e também para estocar o micélio por no máximo 1 mês. A segunda placa é o meio V8 sólido adicionado do Protocolo PARPH (adaptado de Kannwischer & Mitchell, 1978) e utilizada para o isolamento de *P. parasitica*, caso haja contaminação, é possível repicar o micélio para esse meio com o objetivo de re-isolamento. A terceira e última placa é o meio de cultura V8-líquido, muito utilizado durante o projeto para crescimento micelial anteriormente à fase de limitação de nutrientes para formação de esporângios.



Figura 8. Crescimento Micelial de *Phytophthora parasitica* em diferentes meios (v8-ágar; v8-ágar PARPH e v8-ágar PARPH líquido).

- Teste de Inibição *in vitro* com os óleos essenciais

Os quatro óleos essenciais utilizados nesse trabalho (Cravo, Tomilho, Orégano, Capim-limão) foram testados na concentração de 1% (v/v) em placa de Petri contendo o meio V8 e o inóculo de *Phytophthora parasitica*. Os óleos essenciais foram aplicados nas extremidades da placa de Petri de forma a inibir o crescimento micelial de *P. parasitica* inoculado ao centro da placa.

As placas foram montadas em triplicata para cada tratamento, inclusive as placas controle (sem óleo) e fotografadas após 48 horas e 96 horas de crescimento (**Figura 9**).

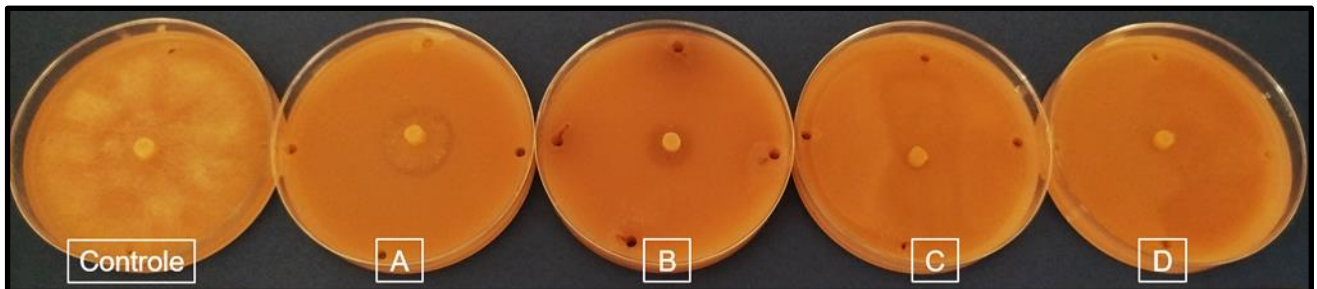


Figura 9. Crescimento Micelial de *Phytophthora parasitica*, após 96 horas, em meio ágar-cenoura com óleos essenciais (1%; v/v) aplicados nas extremidades das placas. (A) Cravo (*Syzyhium aromamicum*); (B) Tomilho (*Thymus vulgaris*); (C) Orégano (*Origanum vulgare*); (D) Capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

Os testes *in vitro* revelaram que 2 óleos essenciais (C) e (D) na concentração de 1% (v/v) inibiram completamente o crescimento de *P. parasitica* em todas as triplicatas. Os óleos essenciais (A) e (B) inibiram parcialmente o crescimento micelial do oomiceto. Tais dados são numericamente apresentados na **Tabela 4**.

O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) revelou que os óleos essenciais de capim-limão e orégano apresentaram inibição total do crescimento micelial, diferindo significativamente de todos os demais tratamentos. O óleo essencial de tomilho apresentou efeito intermediário, enquanto cravo apresentou menor capacidade inibitória. O tratamento controle não apresentou inibição do crescimento.

Tabela 4. Valores encontrados para Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora parasitica* com aplicação dos Óleos Essenciais a 1%.

Tratamento 1%	Componente Majoritário	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média	Teste de Tukey (p ≤ 0,5)
Tomilho	Timol, Carvacrol	87,37	88,01	98,11	91,16	b
Cravo	Eugenol	79,15	80,43	74,75	78,11	c
Capim-limão	Citral	100	100	100	100,00	a
Orégano	Carvacrol	100	100	100	100,00	a

Para os óleos essenciais que inibiram completamente o crescimento (C) e (D), foi testado também triplicatas nas concentrações de 0,05% e 0,1% (v/v). Para os óleos essenciais que inibiram parcialmente o crescimento (A) e (B) foram testadas concentrações maiores dos óleos essenciais de 2% e 3% (v/v). O diâmetro do crescimento micelial foi medido em todas as triplicatas e a média dos valores encontrados para cada tratamento foi aplicada no gráfico (**Figura 10**) que mostra a taxa de inibição de cada óleo.

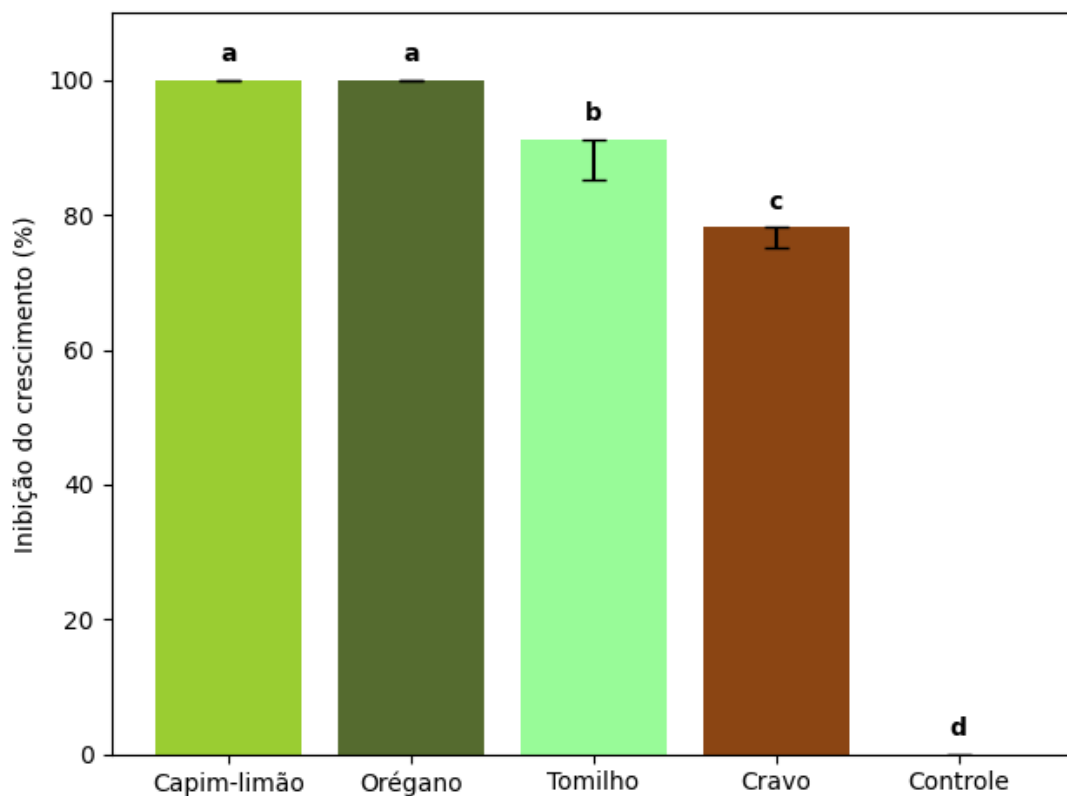


Figura 10. Taxa de inibição (%) de crescimento micelial (eixo y) de *Phytophthora parasitica* frente aplicação de diferentes OEs (1%) (Eixo X). Barras verticais representam a inibição de *P. parasitica* em porcentagem (Eixo Y). Foi usado o método de medição de diâmetro de halo micelial.

Os óleos essenciais de orégano e capim-limão foram diluídos no meio V8 em concentrações seriadas e menores de 1%. O crescimento micelial de *P. parasítica* foi avaliado. As placas foram fotografadas após 7 dias (**Figuras 11 e 12**), quando os diâmetros de crescimento foram medidos para montar a Curva de Inibição (**Figuras 13 e 14**).

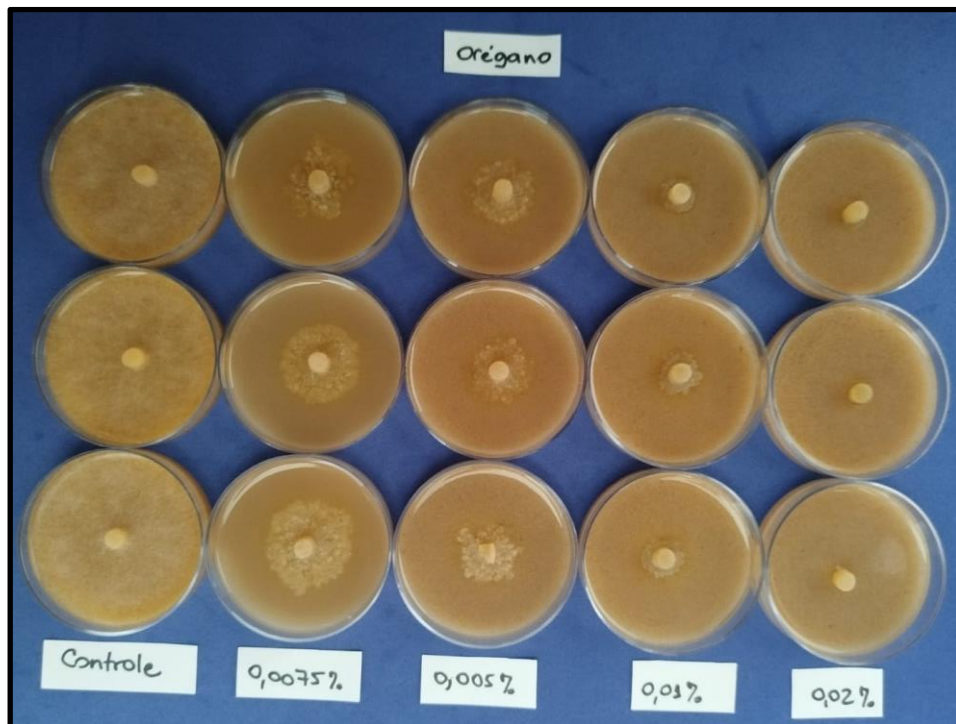


Figura 11. Crescimento micelial de *P. parasítica* no meio v8-sólido com óleo essencial de Orégano diluído em concentrações crescentes.

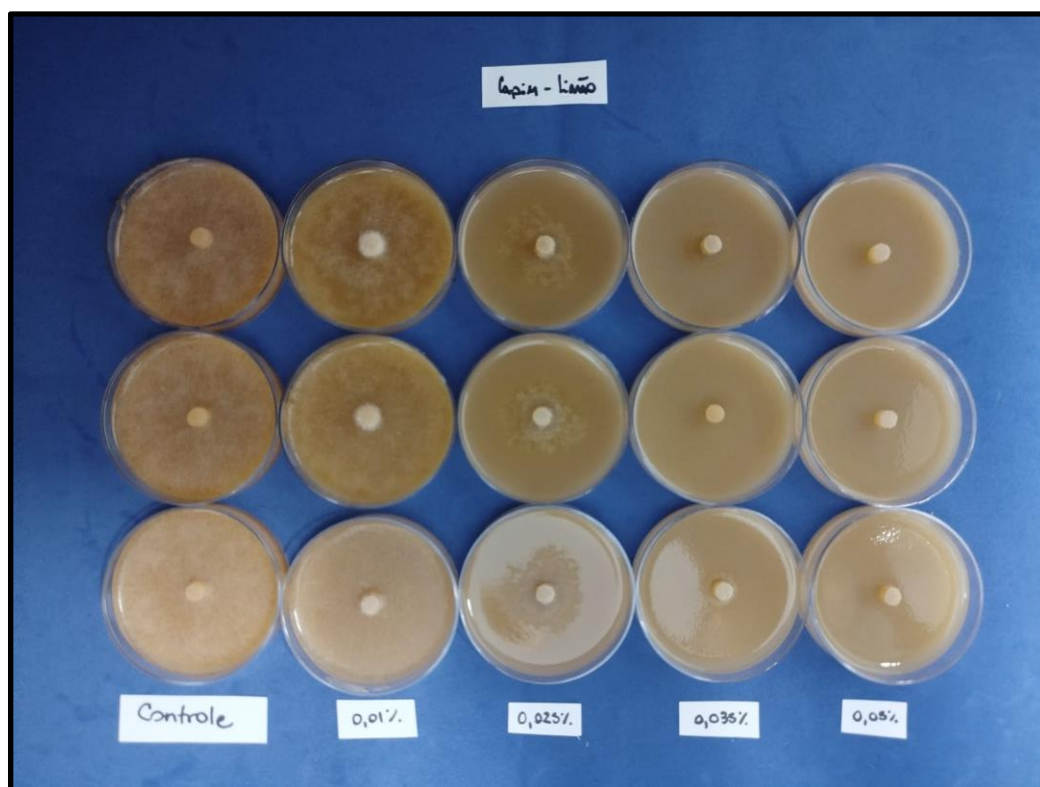


Figura 12. Crescimento micelial de *P. parasítica* no meio v8-sólido com óleo essencial de Capim-Limão diluído em concentrações crescentes.

As placas foram fotografadas após 7 dias de incubação a 20°C no escuro. Os diâmetros de crescimento do micélio foram anotados para cada concentração de Óleo Essencial para serem utilizados na formação dos gráficos abaixo e na determinação da Dose Letal (DL) para cada Óleo Essencial.

Após os dados serem plotados em gráficos, foram identificadas as linhas de tendência para cada Óleo Essencial. Para encontrar o valor de Dose Letal que inibe 50% do crescimento de *Phytophthora parasitica*, foi substituído $y=50$ para encontrar a concentração de OE correspondente (**Figuras 13 e 14**). Dessa maneira a $DL_{50}= 0,00547\%$ para o Orégano e $DL_{50}= 0,02166\%$ para o Capim-Limão foram determinadas (**Tabela 5**).

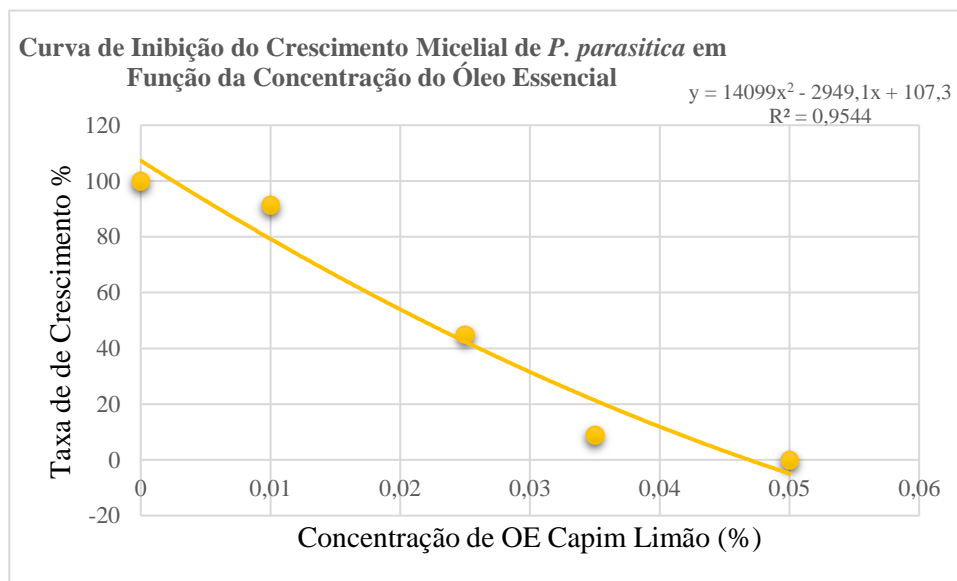


Figura 13. Curva de Inibição do Crescimento Micelial de *P. parasitica* (eixo y) em função da concentração de OE Capim Limão diluído no meio.

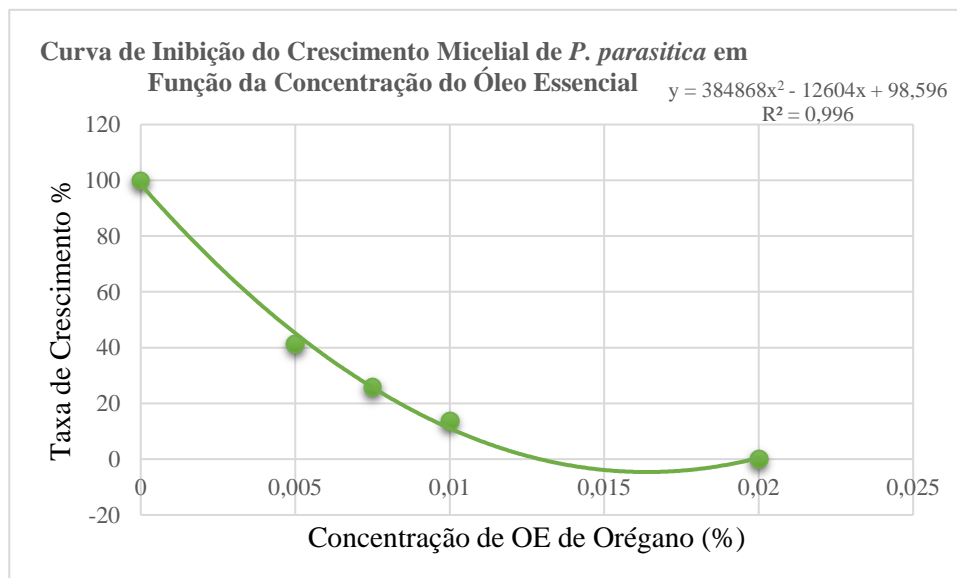


Figura 14. Curva de Inibição do Crescimento Micelial de *P. parasitica* (eixo y) em função da concentração de OE de Orégano diluído no meio.

Tabela 5. Valores encontrados para Dose Letal 50 dos óleos essenciais de Capim-Limão e Orégano na inibição de *Phytophthora parasitica*.

Óleo Essencial	Capim- Limão	Orégano
DL50	0,02166%	0,00547%
DL100	0,05%	0,02%

8.2 Avaliação do crescimento de *Phytophthora parasitica* na presença de B-sitosterol.

O primeiro experimento com o B-sitosterol teve como objetivo testar o melhor método de diluição do B-sitosterol. Na Literatura é possível encontrar muitos métodos de diluição os principais incluem: metanol, etanol, acetona, ethyl acetato e n-hexano (Wei et al., 2010). Há também alguns métodos que diluem o B-sitosterol no clorofórmio ou dissulfeto de carbono. A solubilidade do B-sitosterol no clorofórmio é relatada como sendo aproximadamente 20 mg/mL. Porém, se tratando de um experimento com microrganismos como *P. parasitica*, possivelmente a porcentagem de clorofórmio no meio final poderia apresentar inibições ou interferências no crescimento do Oomiceto. Por isso no experimento da **Figura 15** foi testado a diluição de B-sitosterol em clorofórmio (direita) e diluição de B-sitosterol em Álcool 20mg/mL e posterior diluição em Tris-HCl 1M pH 7.00 (esquerda).

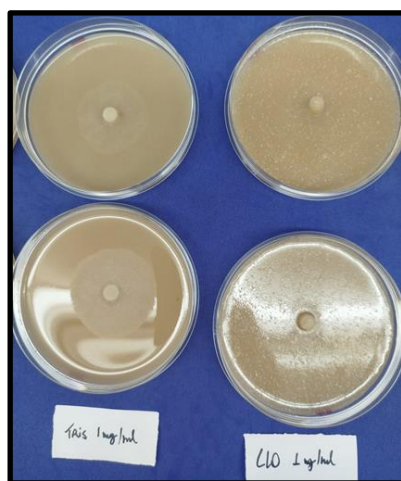


Figura 15. Crescimento micelial em meios de diluição do B-sitosterol em A. Solução Tampão Tris-HCL 1M + 1% de BSA e B. diluído em Cloroformio.

A diluição do B-sitosterol é uma etapa simples, mas se feita de forma errada pode comprometer o resultado final do experimento. Dentre os diluentes mais utilizados o Álcool Etílico é o menos tóxico, para ensaios com adição de microrganismos, como o oomiceto *P. parasítica*. Entretanto, é interessante que o álcool etílico seja diluído em solução de transferência para que não haja interferência no crescimento do oomiceto. A solução de transferência Tris-HCl 1M + 1% de BSA foi eficiente para dissolver o B-sitosterol, como se observa na **Figura 15**, sendo possível notar que a solubilidade de B-sitosterol diluído com Cloroformio não é tão eficiente quanto a solução tampão (Tris-HCl +1%de BSA). Além disso, por consequência da solubilização insuficiente ou por efeitos de inibição causados pelo próprio clorofórmio, foi possível notar que o B-sitosterol diluído em clorofórmio inibiu o crescimento do micélio de *P. parasítica*. Portanto para os experimentos subsequentes foi utilizado apenas a diluição de B-sitosterol em Tris-HCL 1M pH.7.00 + 1% BSA.

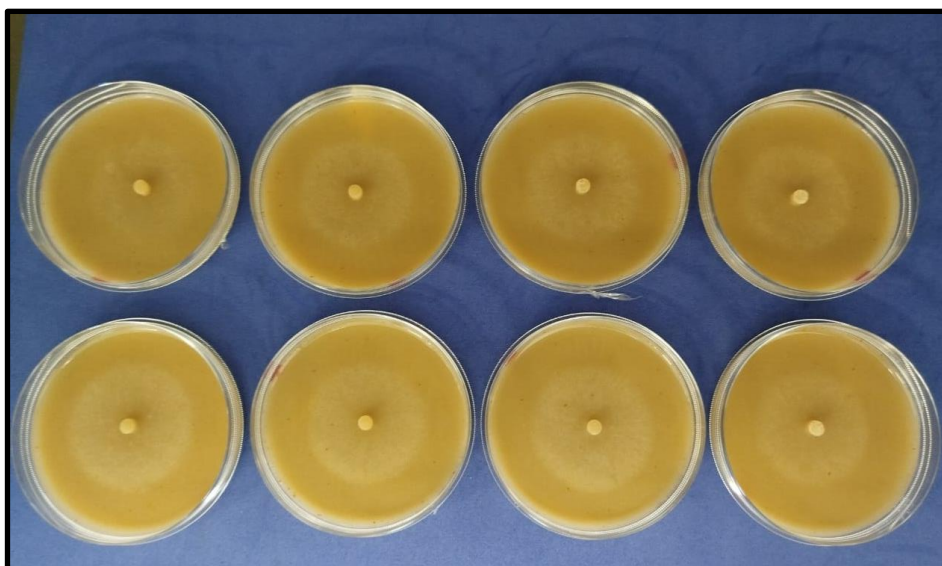


Figura 16. Crescimento Micelial de *Phytophthora parasitica* em diferentes concentrações de B-sitosterol (Tris-HCl + 1% de BSA). (Colunas da esquerda para direita: C-Controle; 1mg/L; 10mg/L; 20mg/L %p/v).

Na **Figura 16** é possível visualizar as placas feitas com diferentes concentrações de B-sitosterol da esquerda para direita: Controle, 1mg/L (0,0001%), 10mg/L (0,001%) e 20mg/L (0,002%). Os diâmetros de crescimento foram medidos, após 5 dias de incubação e após 10 dias de incubação. Os valores dos diâmetros foram compilados em uma planilha para verificar se o B-sitosterol aumentaria o crescimento micelial de *P. parasitica* nas diferentes concentrações encontradas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores medidos. Através desse experimento foi possível visualizar que o B-sitosterol nas concentrações testadas não interferiu na velocidade de crescimento micelial de *Phytophthora parasitica in vitro*.

Ao comparar o tratamento de 1% com o controle é possível verificar que o micélio controle está mais condensado enquanto que o tratamento com B-sitosterol o micélio se apresenta mais espaçado dominando até mesmo as beiradas próximas a borda da placa (**Figura 17**). Com essa perspectiva é possível notar que o B-sitosterol possivelmente altera a morfologia e o crescimento do micélio de *P. parasitica*. Os tratamentos de 7% e 14% foram concentrações muito altas de B-sitosterol, ocorrendo inibição do crescimento micelial. Concentrações intermediárias de 3% e 4% possivelmente permitem o crescimento do oomiceto, porém sua morfologia e crescimento são alterados de forma prejudicial.

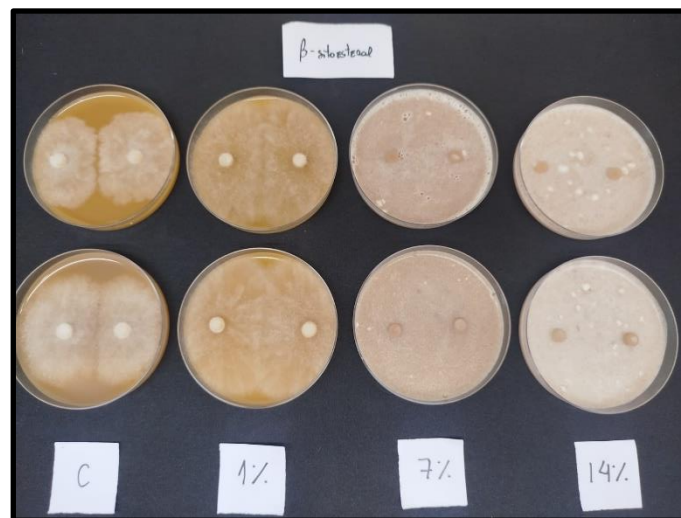


Figura 17. Crescimento Micelial de *Phytophthora parasitica* em diferentes concentrações de B-sitosterol. (C- Controle; % v/v).

Para avaliar a morfologia do micélio em crescimento com B-sitosterol, foi realizado o experimento com a presença e ausência de B-sitosterol em meio líquido v8 ágar. O meio líquido que permite que o micélio cresça e absorva nutrientes sem a limitação de espaço do substrato sólido, sendo uma importante etapa para o crescimento micelial e formação de esporângios.



Figura 18. Crescimento Micelial de *Phytophthora parasitica* na ausência de B-sitosterol. (C-Controle). Observado em Microscopia Óptica com aumento de 10x.

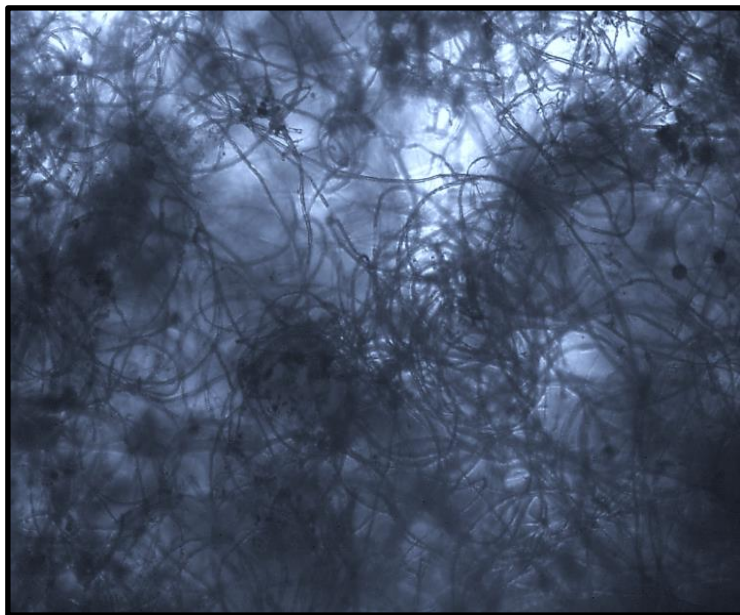


Figura 19. Crescimento Micelial de *Phytophthora parasitica* na presença de B-sitosterol. (C-Controle). Observado em Microscopia Óptica com aumento de 10x.

A visualização da morfologia do micélio na ausência e presença de B-sitosterol indica diferenças perceptíveis em sua estrutura e possivelmente funcionalidade. A **Figura 18** mostra o micélio do oomiceto apresentando crescimento irregular, desordenado e com a presença de muitos esporângios, características comuns para esse estágio de desenvolvimento do *P. parasitica*. Na **Figura 19** é possível identificar anormalidades em comparação ao controle; o desenvolvimento do micélio ocorre de forma circular com a formação de emaranhados, mais alongado e sem a presença de muitos esporângios. Essas características

observadas evidenciam o efeito do B-sitosterol na promoção de crescimento micelial, levando a um crescimento de hifas proeminente. Apesar de haver esporângios no tratamento com B-sitosterol, ocorrem em menor quantidade, o alongamento/crescimento das hifas e micélio é o fenótipo predominante que difere crescimento do Controle, onde é possível observar maior quantidade de esporângios e as hifas com crescimento padrão.

A **Figura 20** mostra a contagem de esporângios após 7 dias da lavagem em água destilada autoclavada (meio limitante). As diferenças nas contagens de esporângios ocorrem devido ao uso de diferentes concentrações de B-sitosterol utilizadas durante a fase de crescimento micelial (V8-líquido). Após a evidência de que o B-sitosterol possivelmente induz o crescimento micelial de *P. parasítica*, foram testadas 3 concentrações de B-sitosterol (0,05%; 0,10%; 1%) sendo que o Controle recebeu apenas solução Tris-HCl + 1% BSA. A hipótese a ser respondida por esse experimento foi a de que a adição de B-sitosterol estimularia o crescimento micelial e após lavadas com água destilada autoclavada estimularia a fase de formação de esporângios (relacionado ao aumento de patogenicidade/ propagação da espécie).

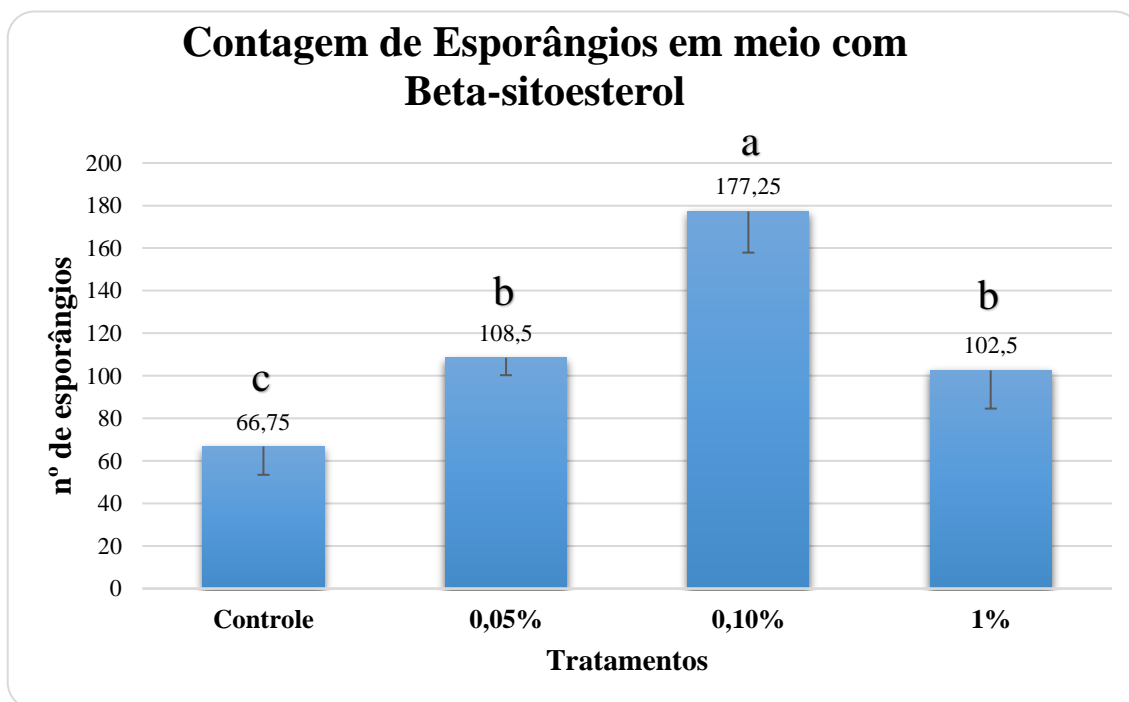


Figura 20. Contagem de esporângios pelo método Câmara de Neubauer, na fase limitante (água destilada autoclavada), em função de diferentes concentrações de B-sitosterol, utilizadas durante a fase de crescimento micelial (meio líquido).

Após esses experimentos com o uso de B-sitosterol, torna-se evidente que a concentração de B-sitosterol no crescimento micelial interfere no desenvolvimento de esporângios e morfologia do micélio. Na presença de B-sitosterol, o oomiceto apresenta crescimento micelial mais proeminente, diminuindo a

formação de esporângios. Porém, caso o B-sitosterol seja lavado do meio, os inóculos de oomiceto que receberam as melhores concentrações de B-sitosterol durante a fase de crescimento micelial terão melhores produções de esporângios na fase limitante. Esse resultado é importante para o entendimento do metabolismo de B-sitosterol em *P. parasítica*, pois traz indícios que o B-sitosterol age como regulador metabólico, ou seja, sua ausência ou presença induz estratégias de sobrevivência diferentes em *P. parasítica*.

Os cultivos que receberam 0,05% (v/v) e 1% (v/v) de B-sitosterol durante a fase de crescimento micelial (Meio Líquido) não diferem entre si na formação de esporângios, mas superaram o Controle em que foi aplicado apenas a Solução de Transferência Tris-HCL 1M + BSA sem B-sitosterol. O tratamento que recebeu 0,10% de B-sitosterol, diferiu de todos os demais, apresentando a maior média do grupo, ou seja, maior formação de esporângios. Os resultados mostraram um aumento na produção de esporângios quando a dose foi aumentada de 0,05% para 0,1%, explicado pela promoção de crescimento micelial; porém quando o aumento na concentração do composto foi para 1% houve diminuição na formação de esporângios em comparação ao tratamento de 0,1%. É possível concluir que nessa concentração o B-sitosterol apresenta possibilidade de efeitos adversos no crescimento, efeitos de inibição, indicando que a Concentração ideal para produção de esporângios e por consequência zoósporos seja próxima de 0,1% (v/V); maior que 0,05% e menor que 1%.

A **Figura 21** mostra em triplicata fotos do micélio de *Phytophthora parasítica* sem B-sitosterol 0,1%. As **Figuras 22 e 23** mostram os cultivos de *Phytophthora parasítica* com B-sitosterol 0,1%. Observou-se que os cultivos que não receberam B-sitosterol (**Figura 21**) não apresentam grandes quantidades de esporângios, após 10 dias no meio limitante (Água Destilada Autoclavada), *Phytophthora p.* ainda não desenvolveu os esporângios em maior quantidade e isso pode ocorrer nos próximos 10 dias em meio limitante. Já nas **Figuras 22 e 23** foi possível visualizar claramente maior concentração de esporângios, com liberação total ou parcial de zoósporos. As imagens mostram ramificações com muitos esporângios, sendo que o tempo de maturação dos esporângios foi mais rápido, pois em apenas 10 dias muitos já liberaram zoósporos.

Essas observações com adição de B-sitosterol 0,1% confirmam os resultados dos experimentos de Contagem (**Figura 20**). Também sugerem que o micélio suplementado com B-sitosterol além de apresentar maior número de esporângios, esses maturam em menos dias e liberam os zoósporos mais rápido do que quando comparado com o micélio não suplementado com B-sitosterol. Portanto, é possível concluir que:

- Na presença de B-sitosterol, *P. parasítica*, otimiza o seu crescimento micelial.
- Micélio crescido na presença de B-sitosterol formam mais esporângios quando expostos a ausência de nutrientes (água destilada autoclavada).
- Micélio crescido na presença de B-sitosterol liberam zoósporos em menor tempo quando exposto a ausência de nutrientes (água destilada autoclavada).

- Mecanismo de liberação de zoósporos por esporângios (fase assexuada) é mais eficiente em micélio que recebeu B-sitosterol no meio de cultivo líquido e, possivelmente, o mecanismo de patogenicidade também seja acentuado.

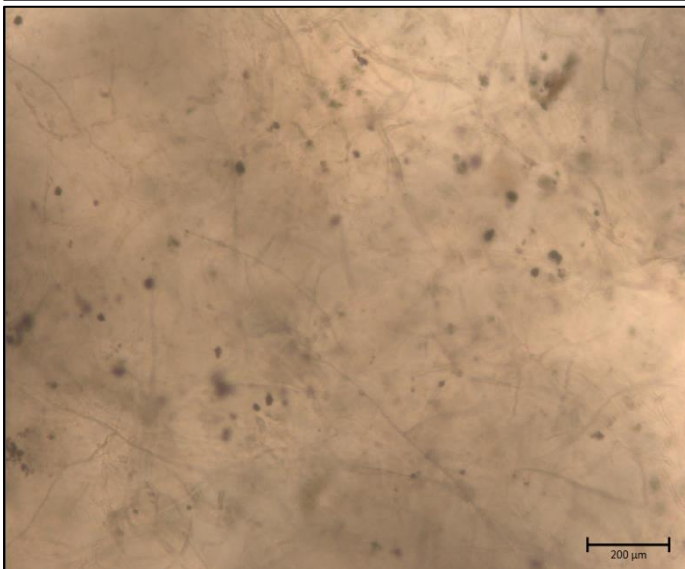
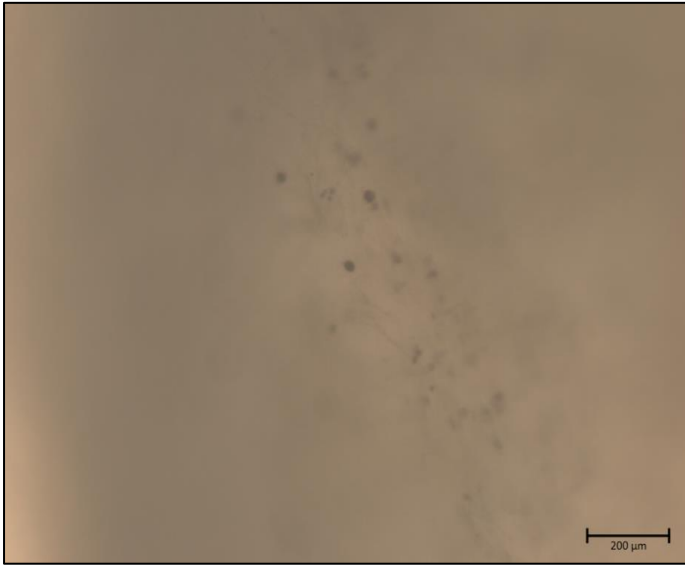
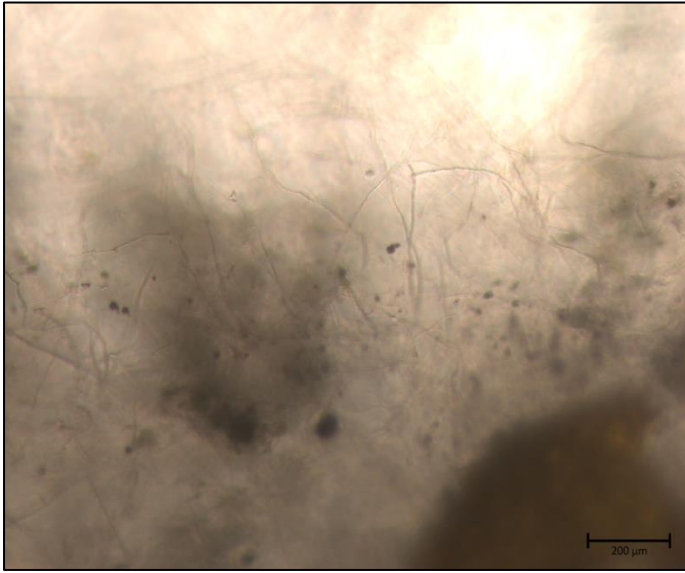


Figura 21. Micélio e esporângios de *P. parasitica* após crescimento e posterior lavagem de meio de cultura líquido sem B-sitosterol 0,1%. Os cultivos permaneceram 7 dias no meio de cultura líquido e 10 dias na água destilada autoclavada. Microscopia óptica com aumento de 10x.

Figura 22. Micélio e esporângios de *P. parasitica* após crescimento e posterior lavagem de meio de cultura líquido com B-sitosterol 0,1%. Os cultivos permaneceram 7 dias no meio de cultura líquido e 10 dias na água destilada autoclavada. Microscopia óptica com aumento de 10x.

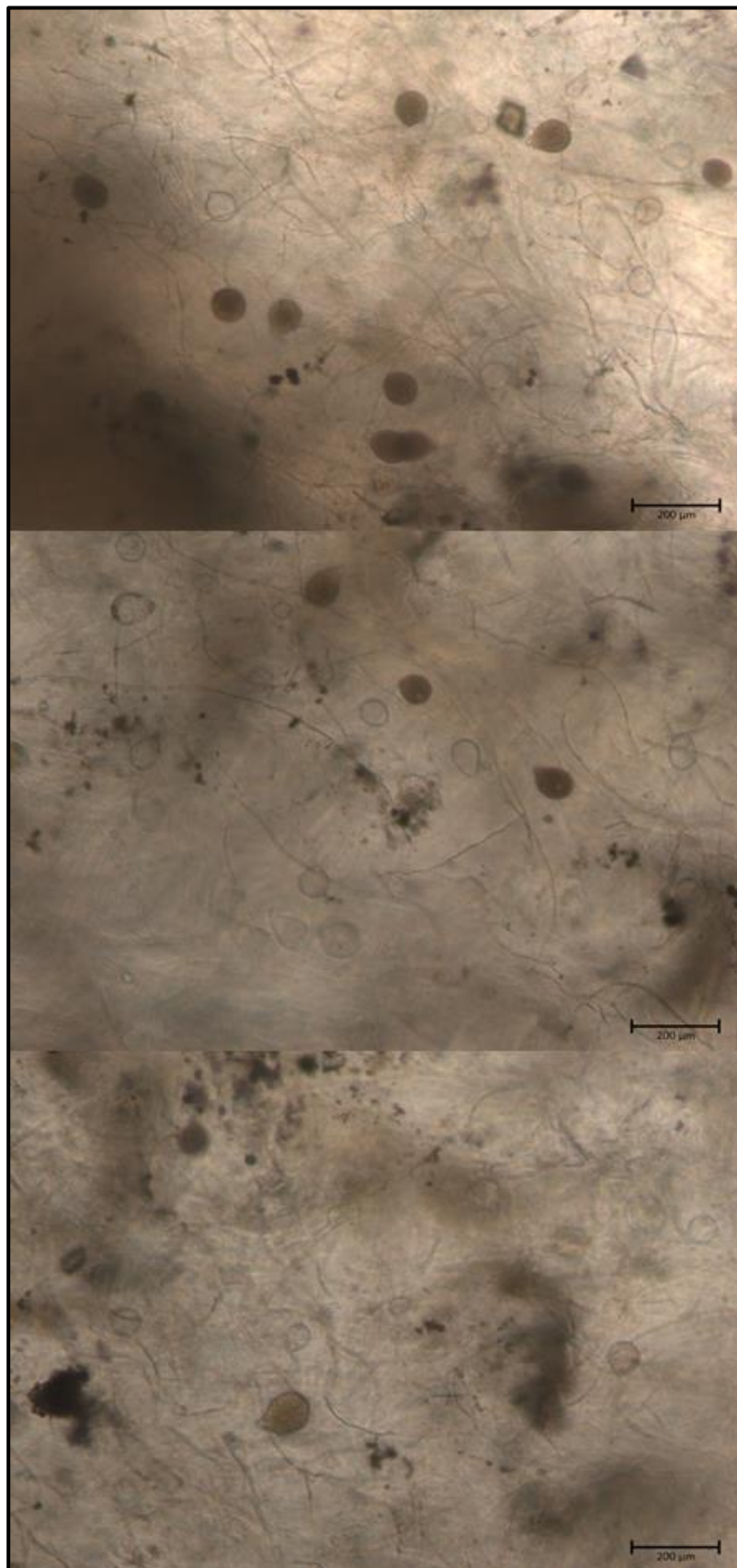
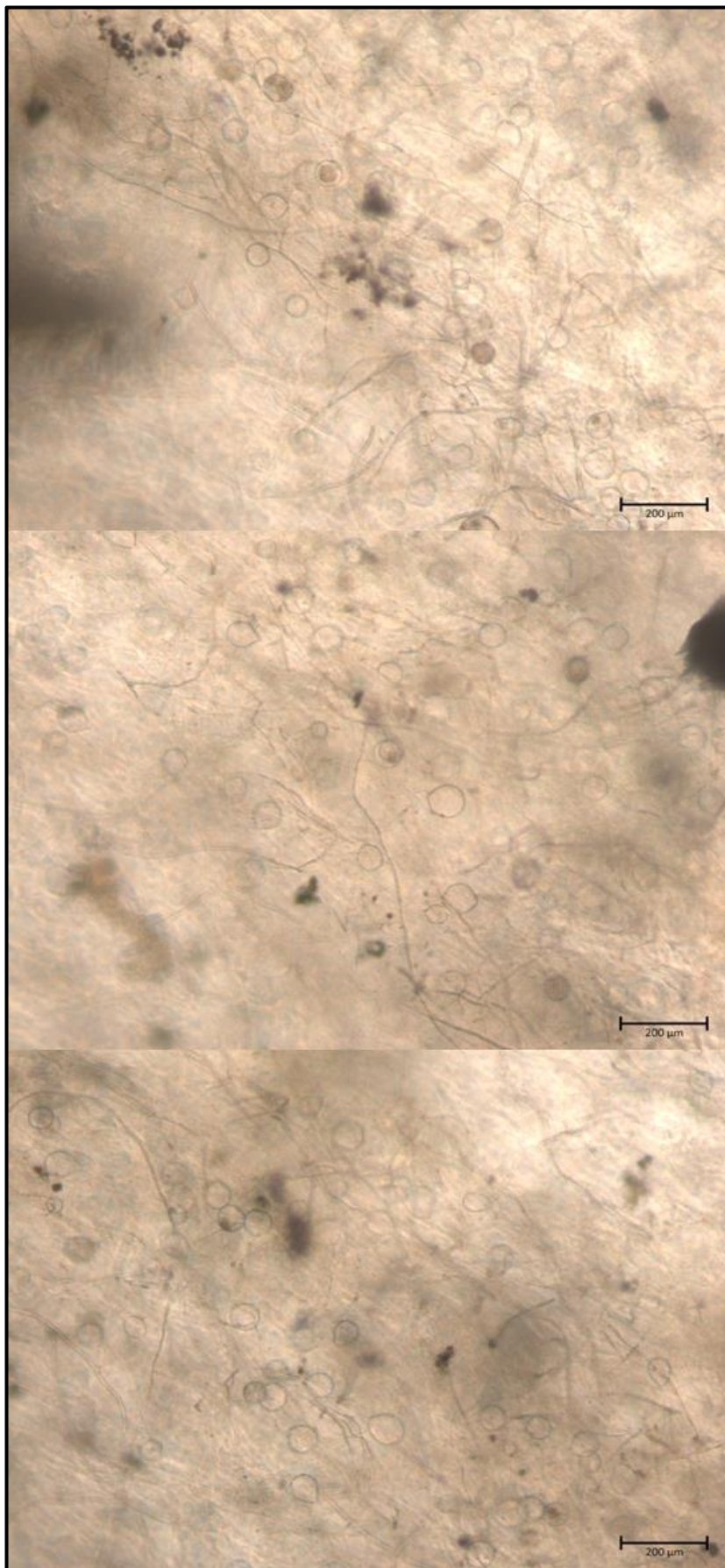


Figura 23. Micélio e esporângios de *P. parasitica* após crescimento e posterior lavagem de meio de cultura líquido com B-sitosterol 0,1%. Os cultivos permaneceram 7 dias no meio de cultura líquido e 10 dias na água destilada autoclavada. Microscopia óptica com aumento de 10x.



8.3 Cultivo de *Phytophthora parasitica* in vitro para inoculação em *Citrus*.

A metodologia escolhida para liberação de zoósporos (Máximo et al., 2017) precisou de algumas alterações com o objetivo de induzir os esporângios das hifas de *P. parasitica* a produzirem zoósporos. O método do limão siciliano cortado ao meio não gerou os resultados esperados (**Figura 24**), porque o oomiceto não cresceu bem, optou-se pelo método de produção de zoósporos descrito por Sophie Eccersall et al (2003).



Figura 24. Cultivo de *P. parasitica* no limão siciliano. (A) O cultivo contaminou por outro microrganismo. (B) O Cultivo não contaminou, entretanto o oomiceto *P. parasitica* não se desenvolveu no limão siciliano.

Após sucessivas tentativas e pesquisas sobre o tema, o protocolo da pesquisadora Sophie Eccersall (“*Phytophthora pluvialis* culture cultivation, maintenance, and detached needle assay protocol, 2003”), garantiu resultados adequados na produção de esporângios e zoósporos de *P. parasitica*. O método consiste em repicar os isolados de *Phytophthora parasitica* em placas de Petri contendo o meio líquido V8. E após 3-4 dias de crescimento micelial, lavar o meio de cultura com água destilada autoclavada; deixando somente água destilada autoclavada por 15-20 dias para que formem os esporângios (**Figura 25**).



Figura 25. Cultivo de *P. parasitica* em água destilada autoclavada, meio limitante. Experimento necessário para gerar esporângios. Os pedaços de folha *citrus* são adicionados para induzir a liberação de zoósporos com ciclos de luz adequados.

As **Figuras 26 e 27** mostram a produção expressiva de esporângios no inóculo de *P. parasitica*. Esse resultado confirmou a metodologia empregada porque permitiu a formação de esporângios em quantidade e densidade superior aos demais testes e metodologias empregadas anteriormente. Após a formação dos esporângios, as placas foram submetidas a tratamentos de luz e frio sucessivas vezes (1 hora de geladeira a 4 °C e 1 hora de luz, de forma a induzir a liberação de zoósporos, **Figura 28**).

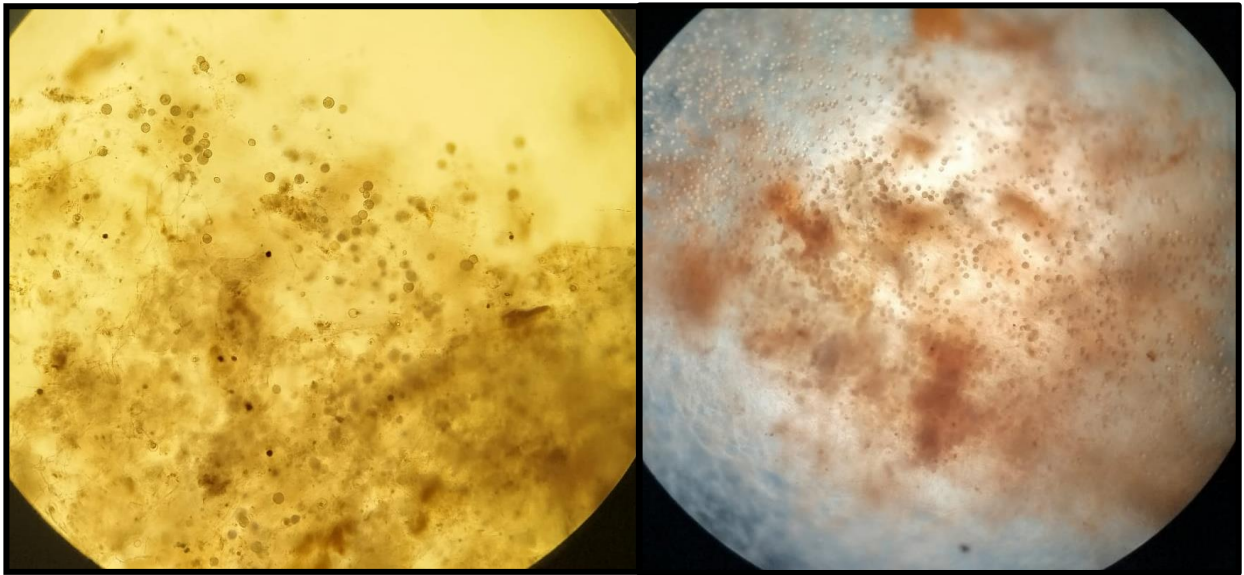


Figura 26. Imagem de Microscopia óptica (10x) de *P. parasitica* em meio limitante para formação de esporângios (20 dias na água para a maior quantidade de esporângios).

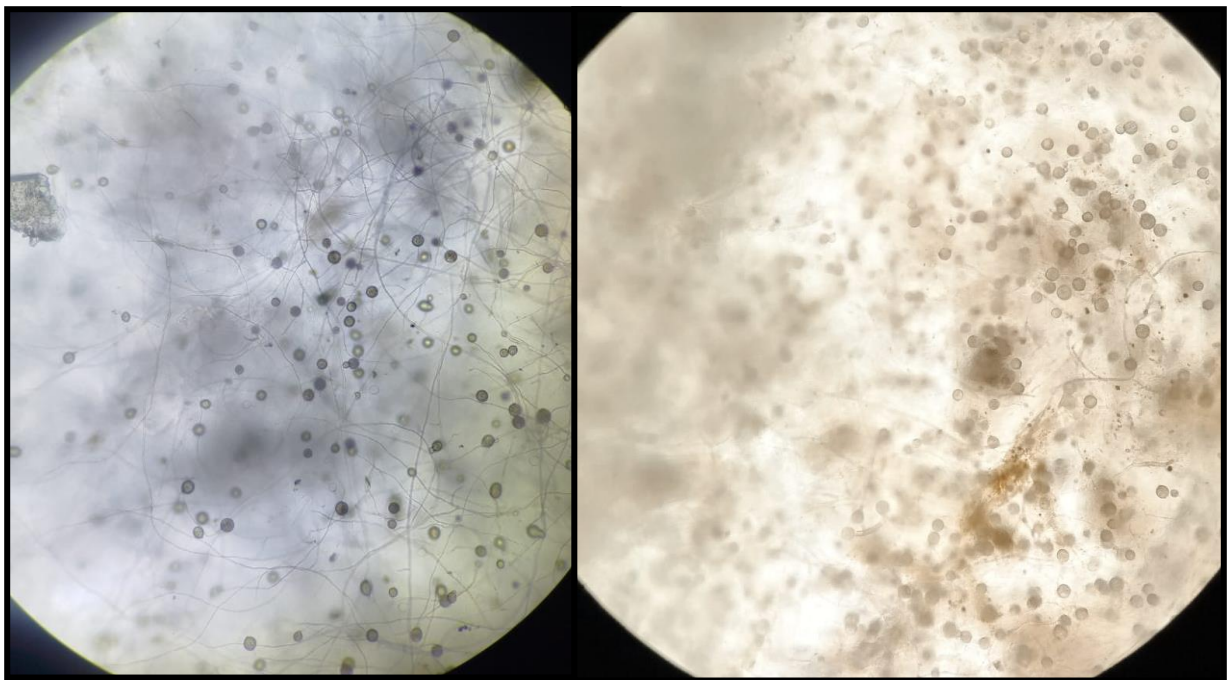


Figura 27. Imagem da Microscopia óptica (10x) de *P. parasitica* em meio limitante para formação de esporângios (20 dias na água para a maior quantidade de esporângios).

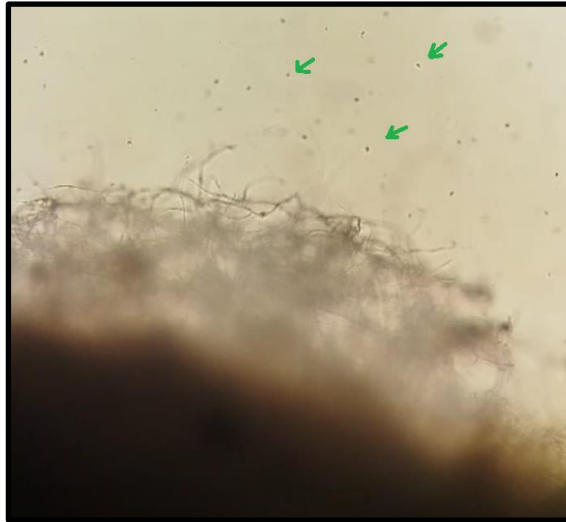


Figura 28. Imagem da Microscopia óptica (10x) de *P. parasitica* durante liberação de zoósporos (indicados por setas verdes).

As raízes das plantas foram picotadas em suas extremidades e a planta foi mergulhada no inóculo para infecção, por 3 horas, antes de voltarem para a terra no tubete. Após o tempo de infecção o restante do inóculo foi despejado sobre o solo e se iniciou a primeira coleta e maceração das raízes após 1h, para posterior extração de DNA e RNA (**Figuras 29 e 30**).



Figura 29. Plantas de *Citrus Sunki* e *Poncirus trifoliata* identificadas para o experimento de inoculação de *Phytophthora parasitica* nas raízes.



Figura 30. Processo para infecção das plantas de *Citrus Sunki* e *Poncirus trifoliata*, emergindo as raízes por 3 horas no meio contendo zoósporos liberados por *P. parasitica*.

8.4 Avaliação sintomática das plantas de *citrus* infectadas por *P. parasitica*.

As plantas infectadas foram analisadas após 1 mês e meio de infecção (50 dias) e comparadas com os controles (sem inoculação) tanto para *C. sunki* quanto para *P. trifoliata*. As **Figuras 31 e 32** mostram a diferença entre as raízes não infectadas (controle) e as infectadas.



Figura 31. Raízes das plantas *Citrus sunki* não infectadas por *Phytophthora parasítica* (à esquerda; controle) e infectadas (à direita).



Figura 32. Raízes das plantas *Poncirus trifoliata* não infectadas por *Phytophthora parasitica* (à esquerda; controle) e infectadas (à direita).

De acordo com a metodologia proposta, após a infecção por *P. parasitica*, as plantas controles positivo, após 50 dias, foram classificadas nos níveis definidos de patogenicidade de acordo com os estudos e publicações da Universidade de Ohio com métodos e classificações publicados para espécies de *Phytophthora* e disponibilizado pela FAO (Food and Agriculture Organization) (Schmitthenner & Ravindra, 1994).

As 3 plantas Sunki e 3 plantas Poncirus, controles positivos, foram classificadas na escala: 1= sem sintomas; 2= leve clorose e leve clareamento de nervuras; 3= evidente clareamento de folhas e/ou nervuras; 4= folhas encarquilhadas, com necrose, clareamento sistêmico e/ou queda.

As plantas Sunki foram avaliadas quanto aos sintomas de infecção e colonização radicular do *P. parasitica*, e observou-se que queda sistêmica das folhas, necrose das raízes e clareamento sistêmico, sendo classificadas no nível 4. Já as plantas Poncirus foram classificadas no nível 2 por apresentarem leve clorose nas folhas e perturbação/desarranjo leve nas raízes.

Criado no final do século XIX, os Postulados de Koch são quatro critérios fundamentais para comprovar que um microrganismo específico é o causador da doença associada. Para confirmar o postulado, as raízes das plantas foram cortadas e lavadas em etanol 90% (**Figura 33**) e posteriormente postas em placas de Petri com meio V8 para o re-isolamento do microrganismo das raízes. A **Figura 34** mostra o crescimento micelial do microrganismo que estava presente nas raízes infectadas. Para confirmar se esse microrganismo é de fato o *P. parasitica* inoculado, foram feitas análises morfológicas, uma nova infecção com o microrganismo isolado e confirmações por qPCR. Todos os 3 procedimentos confirmaram que o material re-isolado foi o mesmo microrganismo utilizado para infecção, confirmando o Postulado de Koch.



Figura 33. Lavagem das Raízes em Etanol e Água e Secagem em papel autoclavado para confirmação do Postulado de Koch.



Figura 34. Plaqueamento da Raízes e crescimento do microrganismo para confirmação do Postulado de Koch.

8.5 Avaliação da expressão dos genes *PpPR-1* *in vivo*.

Esse experimento foi realizado com o objetivo de identificar os diferentes tempos e variações na expressão gênica dos genes *PpPR-1A* a *D*. Após as plantas terem sido infectadas com o inóculo de *P. parasitica* durante 2h30-3h, foi dado início ao tempo de experimento. 5 tempos de coleta foram realizados congelando as raízes em nitrogênio líquido e macerando o material de acordo com os tempos mostrados

(**Tabela 6**). Foram realizadas triplicatas de cada tempo para *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*, sendo Controles ou Tratamentos.

Tabela 6. Experimento de Infecção e Tempos de coleta de cada planta em triplicata.

Variedade	Controle Negativo	Controle Positivo	Tempo de coleta das amostras	Total de Plantas
<i>Citrus sunki</i>	3	3	1h, 12h, 32h, 80h, 128h (cada tempo em triplicata)	15 plantas tratamento + 6 plantas controles
<i>Poncirus trifoliata</i>	3	3	1h, 12h, 32h, 80h, 128h (cada tempo em triplicata)	15 plantas tratamento + 6 plantas controles

Após o congelamento em nitrogênio líquido, maceração e armazenamento fracionado em tubos de eppendorf. Foi realizado a extração de RNA e DNA das amostras, posterior tratamento com enzimas DNase e como citado na metodologia foi realizado a reação da transcriptase reversa para posterior análise por RT-qPCR.

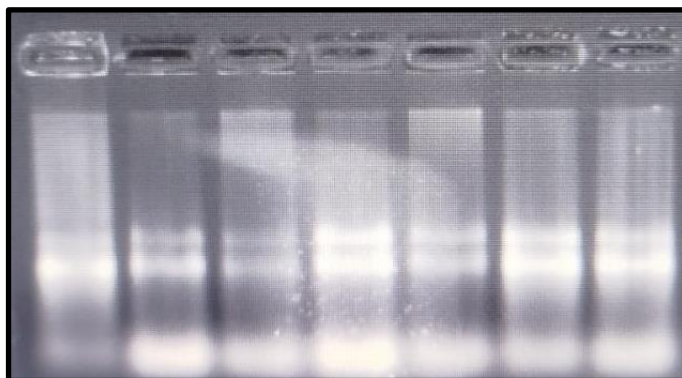


Figura 35. Perfil do RNA em Eletroforese de Gel de Agarose 1%, referentes a extração de RNA e DNA. A extração foi realizada utilizando o protocolo com Trizol®.

A análise dos genes *PpPR-1A* a *D* através do RT-qPCR revela perfis de expressão diferentes durante a infecção de *Phytophthora parasitica* nas raízes de *Citrus* (**Figura 36**). *PpPR-1B* e *PpPR-1C* que foram expressos somente ao final da infecção no último tratamento depois de 128h; *PpPR-1D* foi expresso em

quase todos os tratamentos exceto após 36 horas. O gene *PpPR-1A* foi expresso no início e após 36 horas, sendo o único dos quatro genes expressos neste tempo e o único gene em conjunto com *PpPR-1D* expresso no início da infecção. A análise do padrão de expressão pode representar que os genes *PpPR-1B* e *C* foram acionados no mesmo momento podendo ter funções complementares ou funcionar em conjunto. Os genes *PpPR-1A* e *D* também foram expressos em tempos similares durante a infecção, com a diferença que após 12 horas apenas o *D* foi expresso e após 36 horas apenas o *A*; ao final no tempo 128h a expressão de *A* também cessou enquanto que *D* foi identificado.

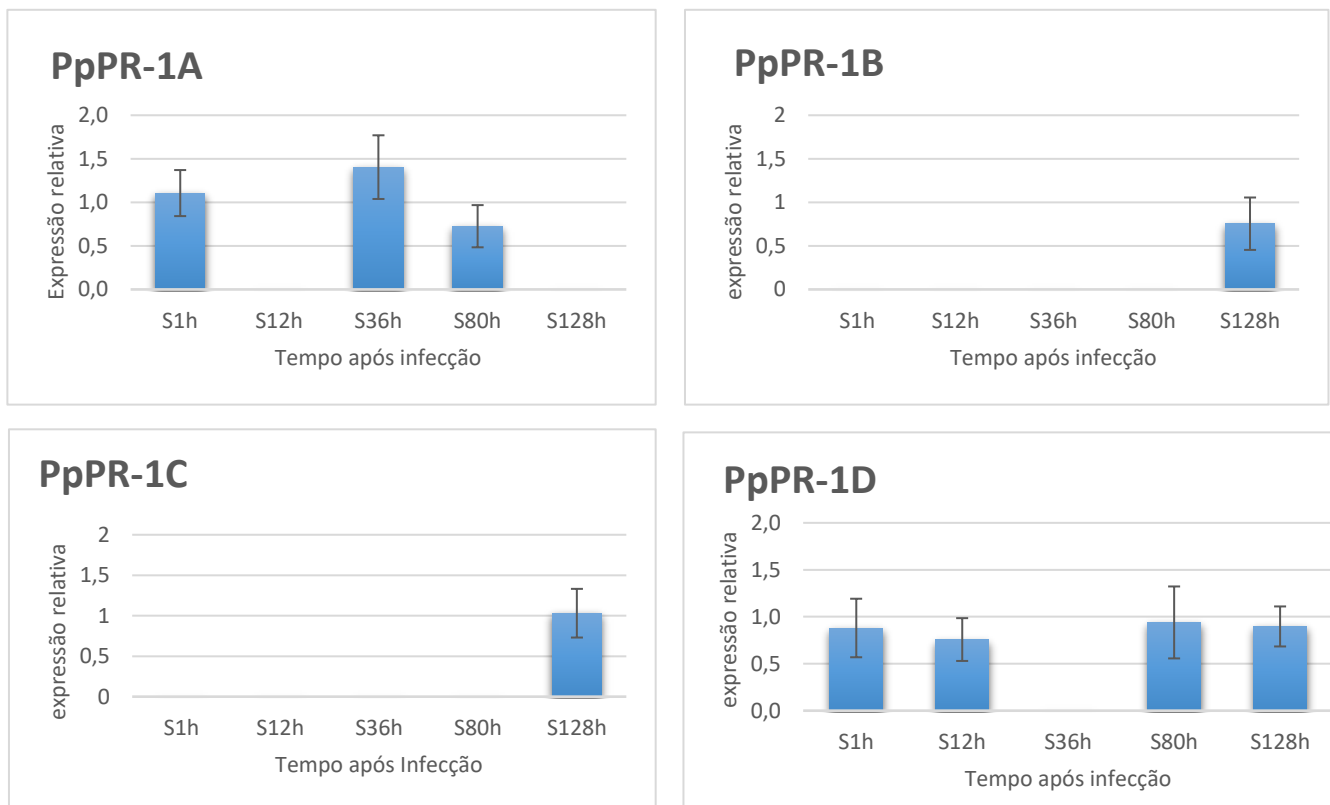


Figura 36. Expressão Relativa das Proteínas *PpPR-1A*, *PpPR-1B*, *PpPR-1C*, *PpPR-1D* em diferentes tempos (1h, 12h, 36h, 80h, 128h) de amostragem após o período de 3h de exposição das raízes das plantas ao patógeno *P. parasítica*, em plantas de *Citrus Sunki*.

Apesar do padrão de expressão trazer indícios sobre o comportamento das proteínas durante a infecção, todos os genes apresentaram expressão próxima de 1 o que é considerado baixo para proteínas expressas somente durante a infecção e que possivelmente teriam ação generalizada no tecido. Isso pode ter acontecido por uma ineficiência na infecção, método, quantidade de zoósporos, desenho experimental, alguns dos aspectos que vamos discutir a seguir sobre esse experimento.

O método de infecção utilizado consistiu em retirar as plantas da terra, mergulha-las juntas na mesma quantidade de inóculo e deixar em contato durante 2 horas e meia a 3 horas, sobre breves agitações ao longo do período. Após esse tempo as plantas voltaram para o tubete com terra. Parte do inóculo foi readicionado por cima da terra. Por conta da dificuldade inicial de liberação de zoósporos as plantas cresceram mais do que o ideal para esse experimento. O método que tem sido utilizado na literatura consiste em adicionar os inóculos com quantidade controlada de zoósporos para tubos Falcon e utilizar plantas menores vedadas em conjunto com o tubo; uma vez retirada da terra a planta permanece o tempo todo em contato com o inóculo. As coletas foram realizadas para determinar o nível de expressão ao longo do tempo. Será necessário repetir esse experimento utilizando a metodologia convencional para que seja possível entender mais sobre esses genes durante a infecção.

Os zoósporos não foram quantificados por uma dificuldade em padronizar os ensaios e ter liberações simultâneas da mesma quantidade de zoósporos, ocorrendo uma variabilidade alta entre as placas onde algumas liberam muitos e outras poucos. É importante salientar que o microscópio para contagem e a centrífuga não se encontram no mesmo laboratório. Por isso, optou-se por sempre utilizar métodos que fracionassem todos os zoósporos de forma igual, para exceder a liberação desejada garantindo uma boa liberação, o que, entretanto, em alguns momentos não foi possível ser realizado. Para os próximos experimentos será interessante validar a quantificação utilizando a centrífuga para concentrar e a Câmara de Neubauer para contagem de alíquota, determinando-se a possibilidade de contar zoósporos encistados ou em movimento. É possível que em meio v8 2% clarificado tenha nutriente suficiente para fazê-los nadar brevemente, facilitando a contagem. Zoósporos encistados apresentam dificuldade para serem contados mesmo com o uso de Microscópio e Câmara de Neubauer.

Como o perfil de expressão não saiu dentro do esperado, o material infectado de *Poncirus trifoliata* não foi avaliado.

8.6 Avaliação dos OEs em contato com *P. parasitica in vitro*.

O objetivo foi avaliar a ação dos óleos essenciais de Orégano e Capim-Limão em contato com o micélio + esporângios de *Phytophthora parasitica* com crescimento de 7 dias em meios de cultura líquido. A sequência de figuras está relacionada a fotos tiradas com Microscopia Óptica do micélio + esporângios após 6 horas de agitação em contato com os óleos essenciais em diferentes concentrações: DL50, DL100, 10xDL100 e 100xDL100.

A **Figura 37** mostra o crescimento micelial na ausência de óleos essenciais, apenas com aplicação do Tween 80 0,5% (v/v). Nas **Figuras 38 e 41** mostram o crescimento de *P. parasitica* em meio com adição de OE de Capim-Limão e OE de Orégano, respectivamente, na dose DL50, foi possível visualizar micélios com segmentos, com sinais de toxicidade a esquerda e micélios + esporângios soltos, nos quais claramente a ação dos compostos dos óleos essenciais desfragmentou a estrutura micelial. Esperava-se que conforme

a dose de OE aumentasse, seria possível visualizar os sintomas citados previamente de forma mais agressiva ou crescente. Porém, este efeito não foi verificado. O aumento das doses causou os mesmos sintomas de enfraquecimento do micélio, ruptura, sinais de toxicidade principalmente nas extremidades do crescimento micelial do *Phytophthora parasitica*. Portanto, o aumento da dose de óleos essenciais causou um aumento da severidade dos sintomas de forma discrepante entre os tratamentos (**Figura 38 a 45**).

Nas placas com a maior concentração de óleos essenciais 100xDL100, foi possível observar um embraquecimento da água destilada autoclavada que circundava o micélio de *P. parasitica*, após 6h de incubação com os óleos essenciais (**Figuras 41 e 45**). Esse embraquecimento ocorreu por conta dos oomicetos terem ficado em agitação, formando uma espécie de emulsão entre água, óleo essencial e componentes degradados do micélio pela ação do óleo essencial. Isso seria uma explicação plausível para as placas com mais concentração de óleo essencial terem um embraquecimento maior do que as com menor concentração. Pelas fotos, não foi possível perceber diferenças significativas na severidade do sintoma.

As **Figuras 38 a 45** mostram partes do micélio que foram afetados pelos mecanismos de ação dos Óleos Essenciais Testados e exibem a dificuldade de categorizar a severidade dos sintomas, não sendo possível observar grandes diferenças no aumento da concentração de OE. Nas figuras os sintomas de enfraquecimento do micélio e sinais de toxicidade são apontados pelas setas verdes enquanto a ruptura é indicada pelas setas vermelhas.

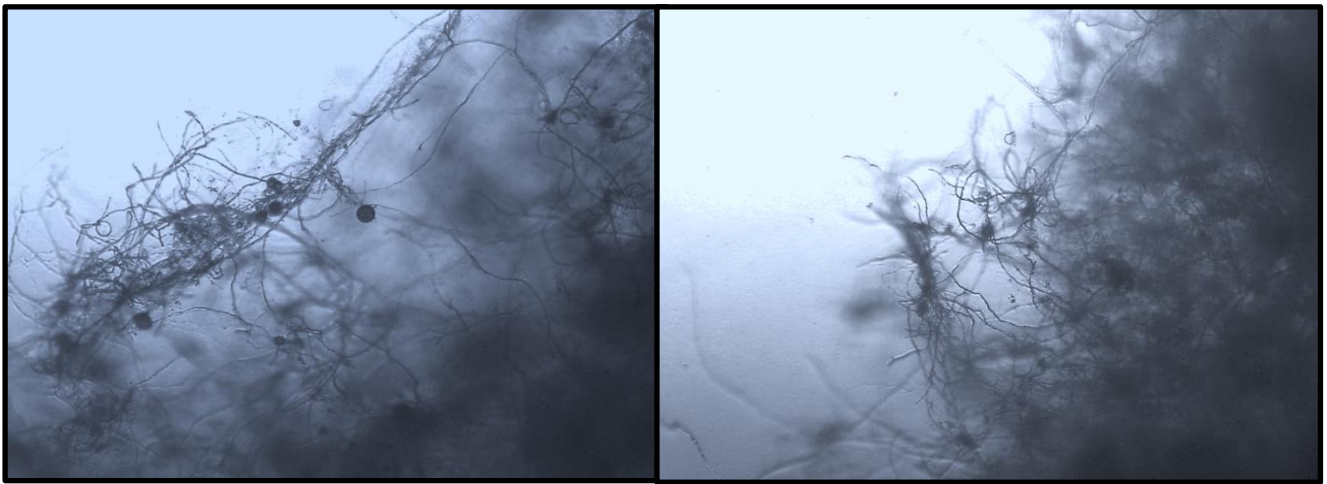


Figura 37. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h na ausência de óleos essenciais, apenas Tween 80 0,5% (Controle) em água destilada autoclavada.

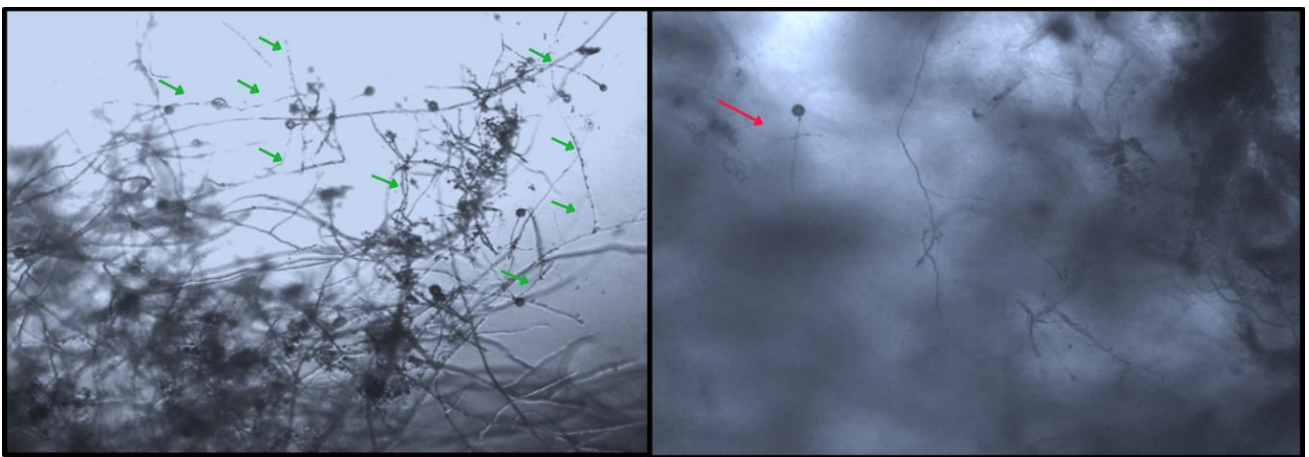


Figura 38. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão DL50 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

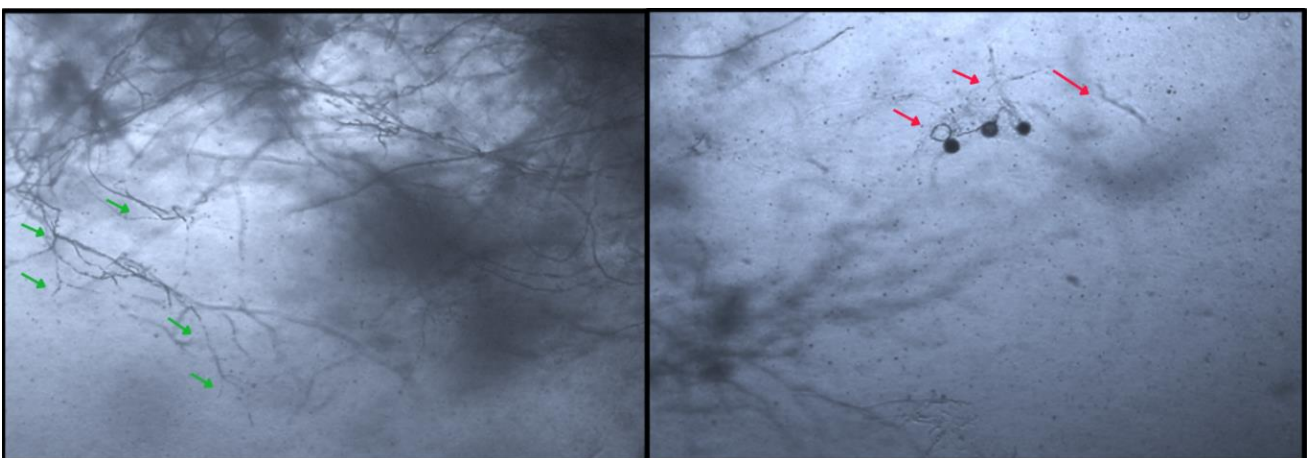


Figura 39. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão DL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

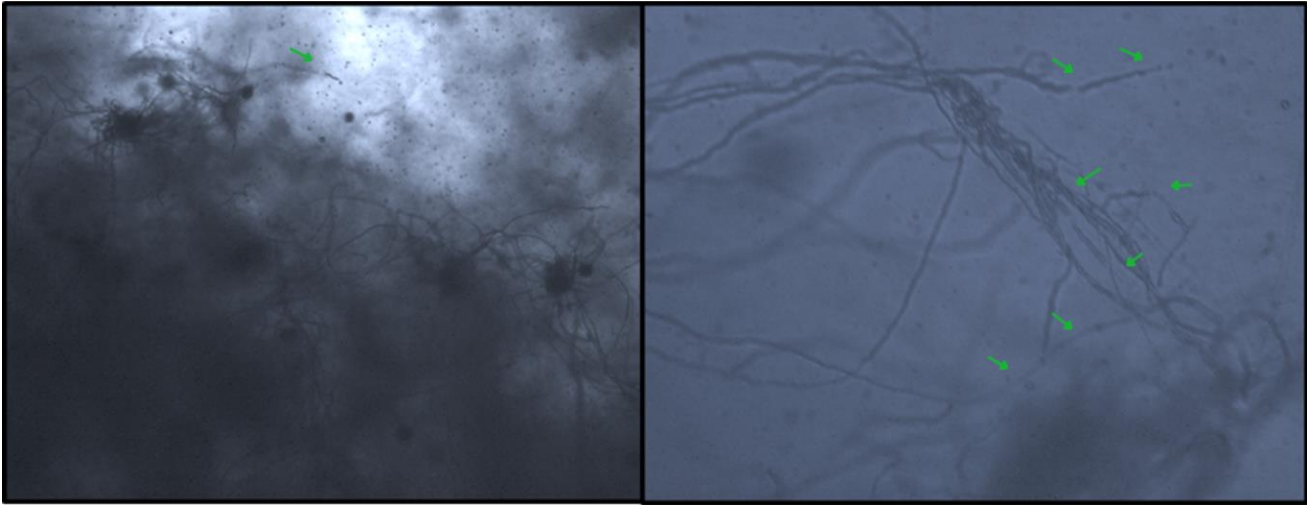


Figura 40. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão 10xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

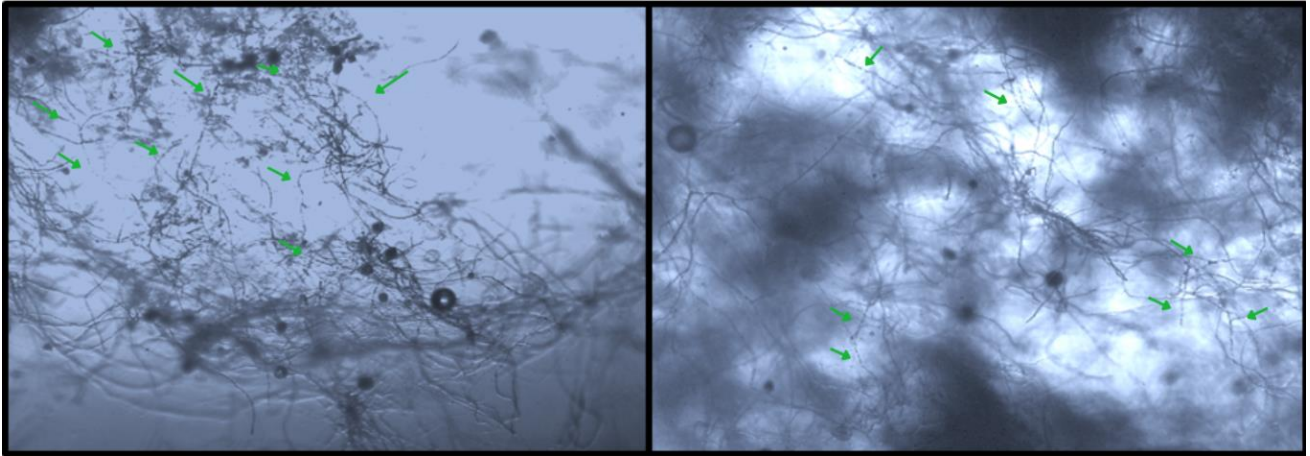


Figura 41. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Capim Limão 100xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

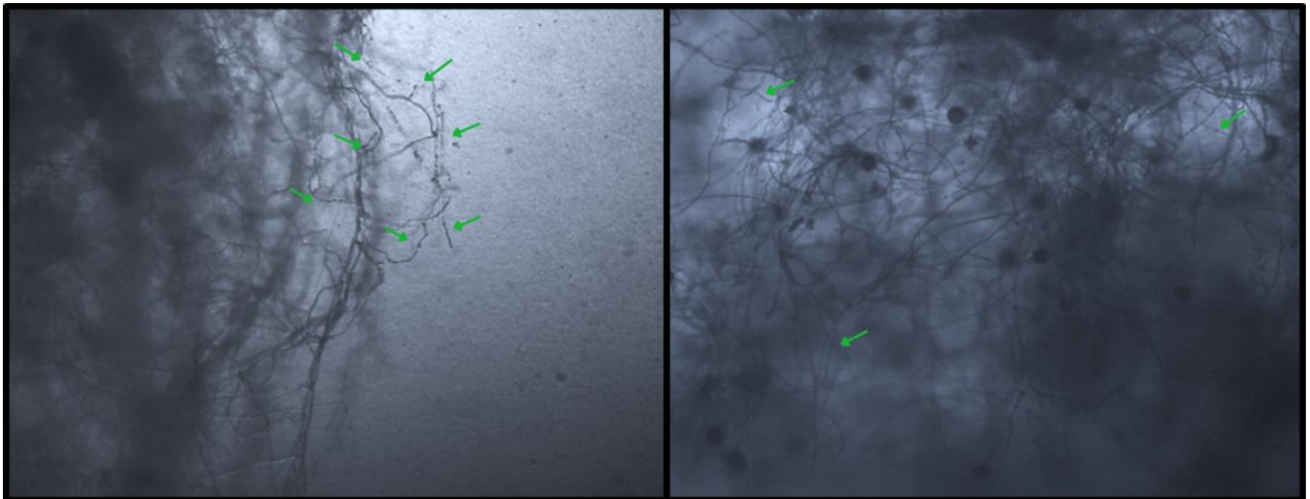


Figura 42. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Orégano DL50 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

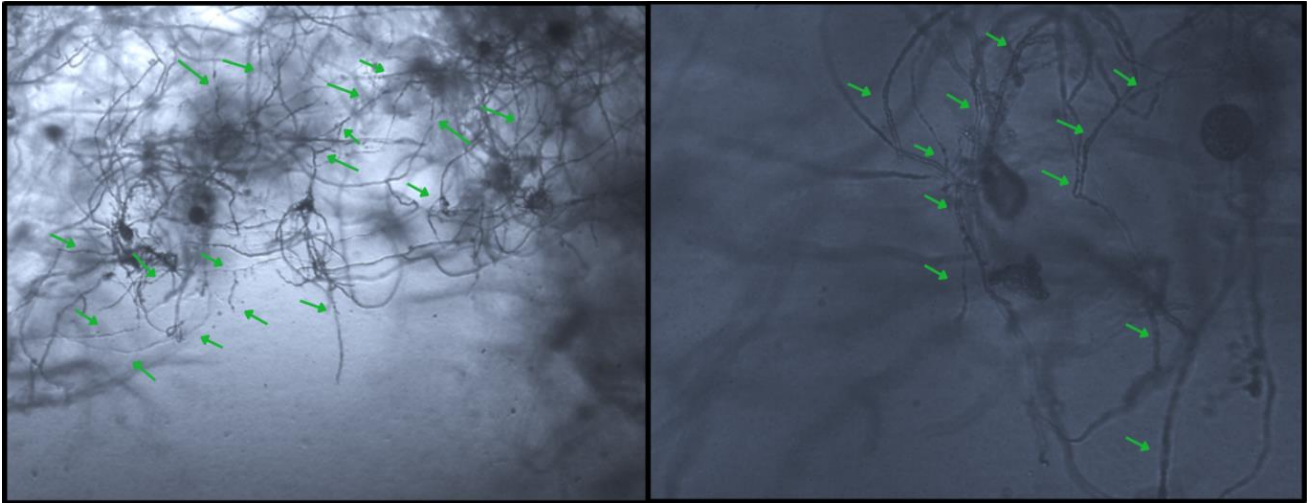


Figura 43. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Orégano DL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

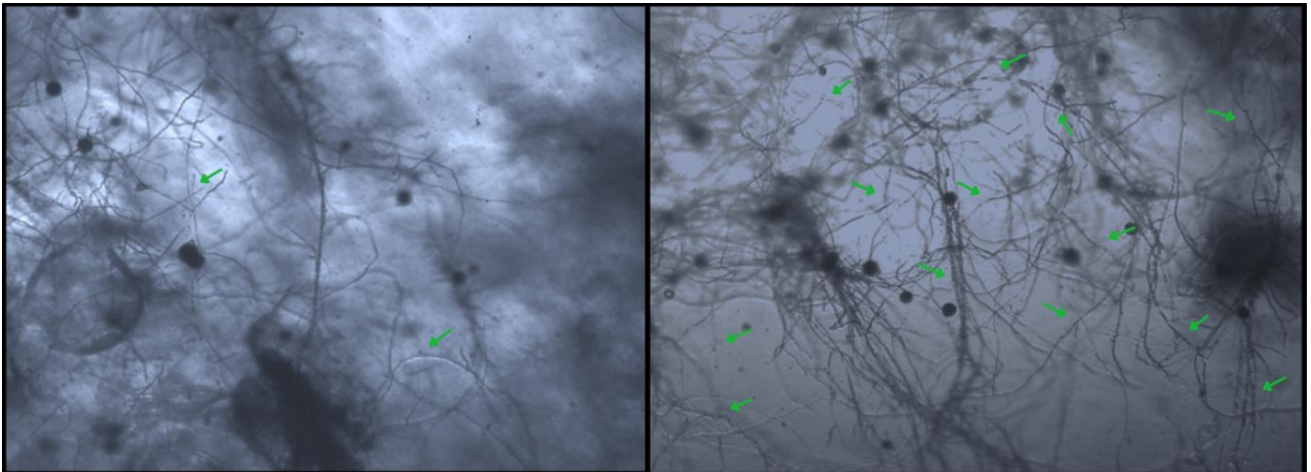


Figura 44. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Orégano 10xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada.

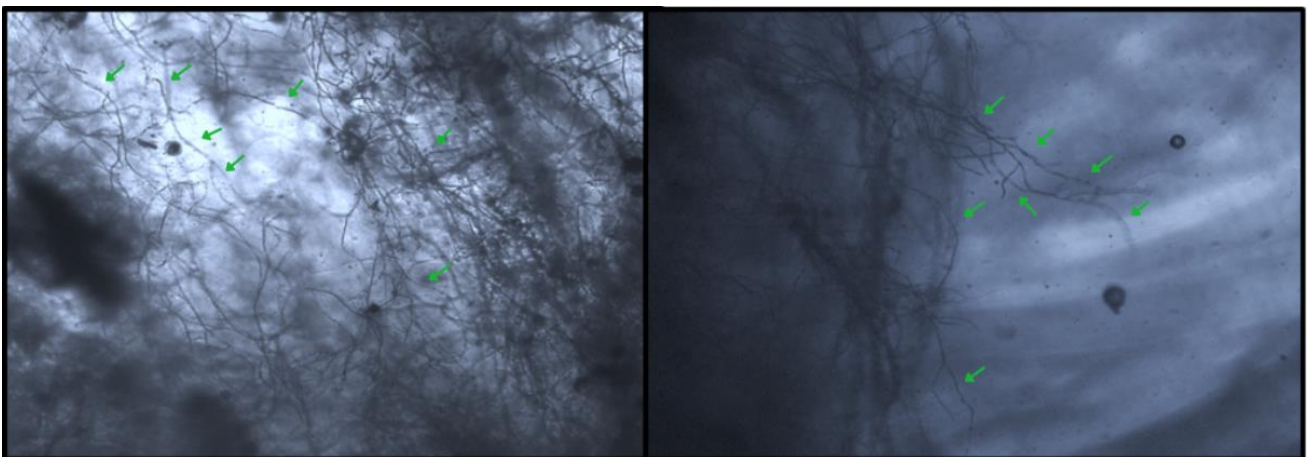


Figura 45. Crescimento de micélio e esporângios de *Phytophthora parasitica* após 6h, com Óleo Essencial de Orégano 100xDL100 e Tween 80 0,5% em água destilada autoclavada..

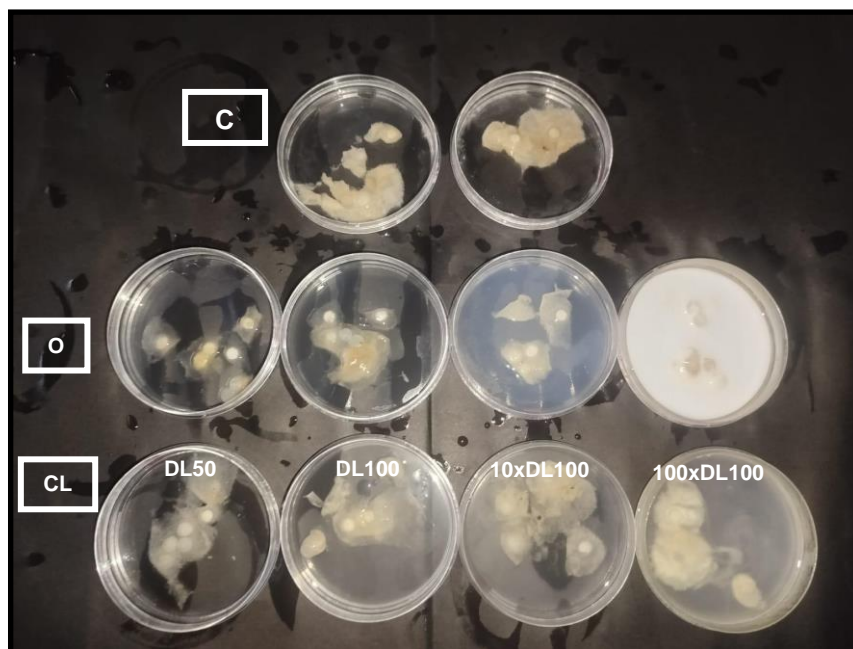


Figura 46. Foto das placas após tratamento com óleos essenciais. Duas placas de cima são Controles (C - apenas foi adicionado Tween 80). A primeira linha de 4 placas são os tratamentos de óleo essencial de orégano (O) da esquerda para direita aumentando a concentração de óleo essencial (O). A segunda linha de 4 placas são os tratamentos com óleo essencial de Capim-limão (CL) aumentando a concentração da esquerda para direita (CL). DL50, DL100, 10xDL100 e 100xDL100.

A **Figura 46** mostra o efeito das quantidades crescentes de óleos essenciais após 6h em agitação nas respectivas concentrações: DL50, DL100, 10xDL100 e 100xDL100. As placas (C) são as Controles aonde só foi adicionado Tween 80. As placas (O) receberam óleo essencial de Orégano. As placas (CL) receberam óleo essencial de Capim-Limão. Nos tratamentos com maior concentração de Óleo essencial: 10xDL100 e 100xDL100, é possível visualizar o embranquecimento do meio que foi mais acentuado para a amostra de maior concentração de óleo essencial de orégano, porém também ocorre com óleo essencial de capim-limão. A partir dos resultados desse experimento, foi realizado um experimento apenas com a concentração 100xDL100 de ambos os óleos essenciais para extração de DNA/RNA e analisar o nível de expressão dos genes PpPR-1A a D, fazendo-se amostragem após 3 horas e 32 horas em contato com os óleos essenciais e depois foram congelados e macerados. O perfil do RNA extraído utilizando o kit Mini Plant Qiagen se encontra na **Figura 47**. Os Controles não receberam óleo essencial apenas 0.5% Tween 80.

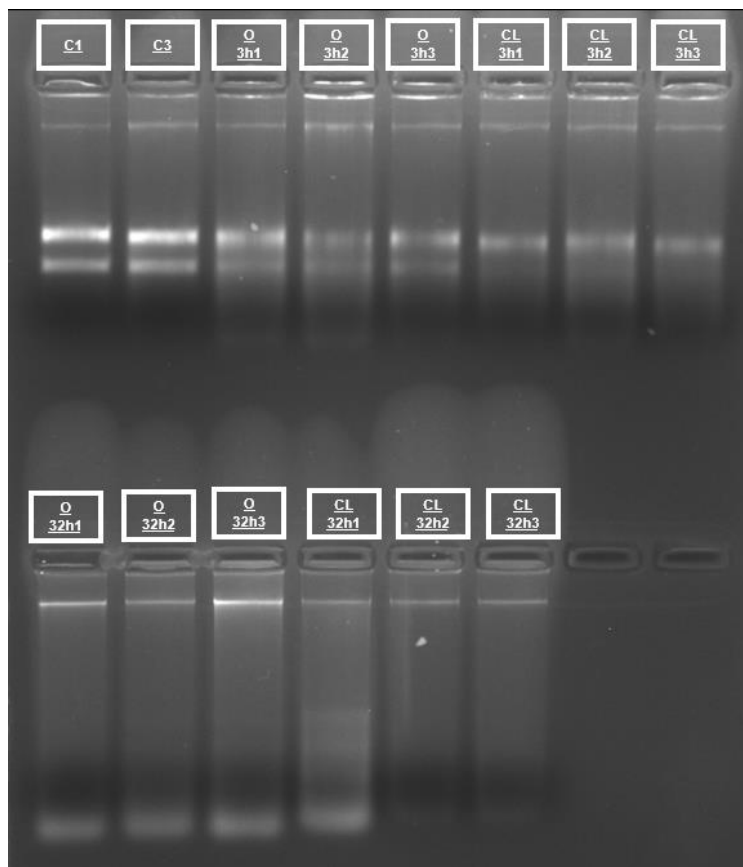


Figura 47. Gel de Agarose 1% com as Amostras das extrações de RNA de *Phytophthora parasitica* após contato com os Óleos Essenciais de Capim-Limão e Orégano 3 horas e 32 horas.

Somente foi possível extrair o RNA do material micelial tratado por 3 horas com os óleos essenciais de orégano e capim-limão bem como os controles. Porém para as amostras que ficaram em contato com os óleos essenciais por 32 horas, o RNA parece ter sido degradado. Sugere-se que o óleo essencial em contato prolongado com o micélio de *Phytophthora* pode de alguma forma interferir na expressão do RNA ou na integridade do RNA expresso. Esse resultado pode estar relacionado a ação dos óleos essenciais sobre o microrganismo, ou seja, os compostos dos óleos essenciais podem causar degradação da membrana das hifas e micélios, expondo o conteúdo intracelular e seu RNA sendo degradado. Os resultados do RT-qPCR revelaram de forma inequívoca que os genes *PpPR-1A*, *PpPR-1B*, *PpPR-1C* e *PpPR-1D* não são expressos durante a fase de micélio + esporângios de *Phytophthora parasitica* (**Tabela 7**). Esse padrão também foi observado no controle tratado apenas com Tween 80, indicando que, caso esses genes fossem naturalmente expressos durante a fase de esporulação, tal expressão teria sido detectada nesse tratamento. Dessa forma, conclui-se que os tratamentos com os óleos essenciais de orégano e capim-limão não alteraram o estado transcricional desses genes, uma vez que a ausência de expressão foi mantida mesmo na presença dos compostos. Assim, os genes *PpPR-1A* as *D* permanecem transcionalmente inativos nessa fase do ciclo de vida de *P. parasitica*, não sendo diferencialmente expressos em resposta ao contato com os óleos essenciais avaliados.

Tabela 7. Valores de ciclos limiares (C_t) obtidos em amostras de cDNA de *Phytophthora parasitica* (fase micelial e esporângios). Os dados representam as replicatas técnicas de amostras tratadas com óleos essenciais e controle (3 h de incubação). Valores "Não identificados" indicam ausência de amplificação em até 40 ciclos.

	<i>UBC</i> (C_T)	<i>PpPRI-A</i>	<i>PpPRI-B</i>	<i>PpPRI-C</i>	<i>PpPRI-D</i>
CONTROLE 1	21,69481	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
CONTROLE 2	21,37478	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
CONTROLE 3	22,14952	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
ORÉGANO 3H 1	31,89956	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
ORÉGANO 3H 2	31,9969	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
ORÉGANO 3H 3	38,66265	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
CAPIM-LIMÃO 3H 1	28,06109	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
CAPIM-LIMÃO 3H 2	27,90001	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado
CAPIM LIMÃO 3H 3	30,80516	Não identificado	Não identificado	Não identificado	Não identificado

8.7 Microencapsulação de óleos essenciais por gelificação iônica com pectina e cálcio

A microencapsulação dos óleos essenciais com pectina e cálcio foi sugerida como uma opção para contornar algumas das problemáticas no uso de óleos essenciais como suas propriedades voláteis. Uma microencapsulação feita de acordo com o planejado poderia reter a liberação dos compostos presentes nos óleos essenciais entre 10 e 15 dias liberando gradualmente os compostos ao longo do tempo e, se confirmado sua eficácia, manteria a planta livre dos efeitos mais severos do patógeno. Os testes que seguem são os ensaios de composição e testes de estabilidade para determinar as condições de reticulação. A partir dos primeiros resultados é possível alterar parâmetros para elaborar partículas mais rígidas, menos rígidas, com maior ou menor tempo de liberação. Os principais parâmetros a serem alterados seriam: % de pectina, % de óleo, molaridade de cloreto de cálcio. O tempo e a molaridade do banho de cloreto de cálcio, aonde são gotejadas as emulsões de pectina e óleo, também são muito importantes para maior ou menor reticulação.

O estudo realizado por Sriamornsak et al (2004) analisou o diâmetro e a flutuabilidade das esferas de gel de pectina de cálcio convencionais e impregnadas com óleo, feitas de pectina (LM-104) e vários tipos diferentes de óleo em soluções teste. Os óleos analisados foram: óleo mineral, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de milho, óleo de arroz, óleo de sésamo e óleo de hortelã-pimenta. Os dados encontrados por esse estudo foram relevantes uma vez que os autores testaram diversas concentrações de óleo (5%-40%) com diferentes tipos de óleo nas microencapsulações de esferas pectina/cálcio. A partir da análise desse estudo e dos melhores resultados obtidos, foi possível determinar algumas concentrações teste para as primeiras emulsões com óleo de soja, de forma a conferir estabilidade e gelificação em banho com CaCl_2 (0,34M). As concentrações-teste foram definidas de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 8. Composição das Emulsões Testes 1, 2 e 3, variando concentração de pectina e de óleo para formação de esferas Pectina de Cálcio por gelificação iônica.

<i>Emulsão O/W</i>	<i>Pectina</i>	<i>Óleo de Soja</i>
1	5g (75g água)	20g
2	2g (70g água)	10g
3	4g (75g água)	21 g

De acordo com os testes de concentração de pectina e a análise de viscosidade, estabilidade e força de gelificação foi possível visualizar alguns parâmetros. A **Figura 48** mostra os testes das 3 emulsões realizados, onde as emulsões 1 e 2 apresentam formação não circular, um aspecto da gelificação comumente chamado de formação satélite, quando a viscosidade da emulsão afeta o gotejamento no banho de CaCl_2 de modo a alterar a formação da cápsula reticulada. Na Emulsão 1 a viscosidade da solução não trouxe exatamente desafios para seu gotejamento, diferente da Emulsão 3 em que a viscosidade da emulsão acarretou dificuldade para o gotejamento criando fios de emulsão com maior facilidade do que gotas. Possivelmente, para a Emulsão 1 o banho gelificante de CaCl_2 a 0,34 M não tem força suficiente para reticular no formato cápsula. Portanto, aumentar a concentração de CaCl_2 no banho pode ser uma tentativa eficaz para normalizar o formato e estabilidade das cápsulas reticuladas.

A Emulsão 2 apresentou aspectos esperados para uma gelificação eficiente. A baixa concentração de pectina facilita o manuseio da emulsão e agitação, as cápsulas apresentam resistência mecânica. Desse modo e para dar sequência aos testes, uma questão foi levantada. Qual seria o carregamento (Load) máximo possível em óleo para a Emulsão 2? Os testes subsequentes foram realizados com objetivo de responder essa questão e para isso foram testados novas concentrações-teste definidas na tabela abaixo:

Tabela 9. Composição das Emulsões Testes 4, 5, 6 e 7, variando a concentração de pectina e de óleo para formação de esferas Pectina de Cálcio por gelificação iônica.

<i>Emulsão O/W</i>	<i>Pectina</i>	<i>Óleo de Soja e Essencial</i>
4	2g (70g água)	10g
5	2g (70g água)	13g
6	2g (70g água)	20 g
7	3g (75g água)	30 g

As Emulsões 4, 5 e 6 foram testadas tanto com o óleo de soja quanto com os óleos essenciais de capim-limão e orégano. Até 20g de fração óleo, a gelificação iônica ocorre de forma eficiente formando a cápsula na forma de reticulado, conforme esperado. A Emulsão 7, em que a fração de óleo foi aumentada para 30g, a reticulação não ocorre da forma esperada, devido a força iônica necessária para “segurar” a alta concentração de gordura dentro da cápsula reticulada.



Figura 48. Emulsão 7 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação. Gelificação sem força suficiente para reticular a alta concentração de load.

Com a observação desses resultados foi determinado a utilização da emulsão 6 nos testes subsequentes. Foi o teste aonde a gelificação ocorreu de forma estável com a maior concentração de óleo (*load*). Os testes subsequentes visam entender o tamanho das cápsulas ao alterar a pressão de ar e a vazão da emulsão durante o processo de gotejamento. O Bico disponível para gotejamento por gelificação iônica no Laboratório de Inovação de Alimentos (FEA-UNICAMP) é o de 0.7 mm. Considerando a viscosidade da emulsão 6 e o espectro de variação de pressão/vazão, apenas dois resultados geraram gelificações uniformes com cápsulas arredondadas. A diferença no tamanho das cápsulas reticuladas diz respeito a variação de intensidade nas duas variáveis alteradas. No processo (A) foi utilizado pressurização média de 50ppm e vazão baixa de 3. No processo (B) foi utilizado pressurização baixa e alta vazão da emulsão.

Em decorrência da natureza da emulsão Pectina associada ao óleo e sua viscosidade, é possível que o aumento da pressão também esteja aerando a gota no momento de gotejamento e conseqüentemente o seu tamanho final após o banho de reticulação. Essa característica durante o processo de gotejamento é um desafio na tentativa de redução no tamanho final de partícula. O melhor resultado obtido para diminuir o tamanho final de partícula foi obtido apenas ao reduzir a pressão de ar e aumentar a vazão da emulsão no bico gotejador (**Figura 49**).

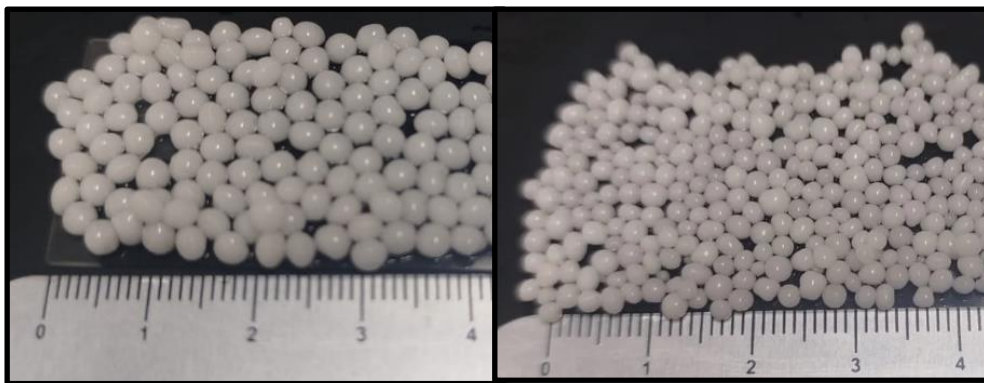


Figura 49. Foto do tamanho de cápsulas produzidas com alteração nas variáveis Pressão/Vazão (A) Pressão Alta, Vazão Baixa; (B) Pressão Baixa e Vazão Alta.



Figura 50. Emulsão 1 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação.

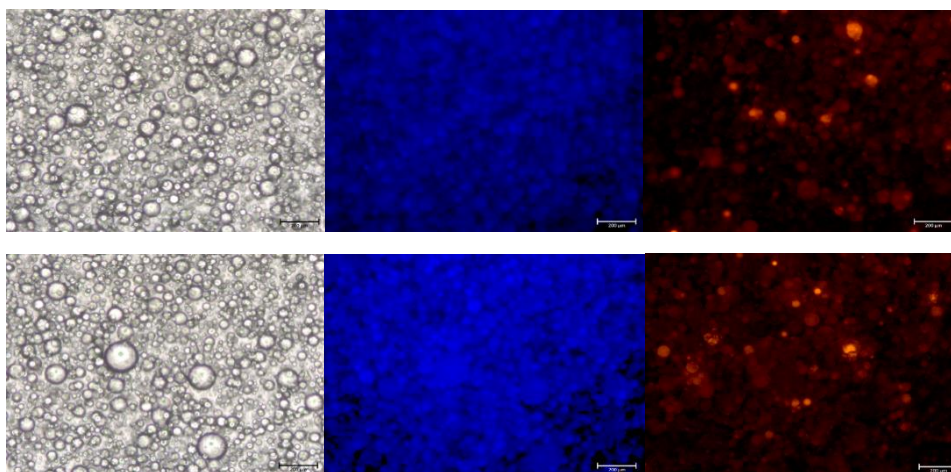


Figura 51. Microscopia Óptica de Fluorescência da Emulsão 1. Calcofluor branco utilizado como corante para carboidratos (pectina) e Vermelho do Nilo utilizado como corante para fase óleo. Aumento de 50x (traço – 200 μm).

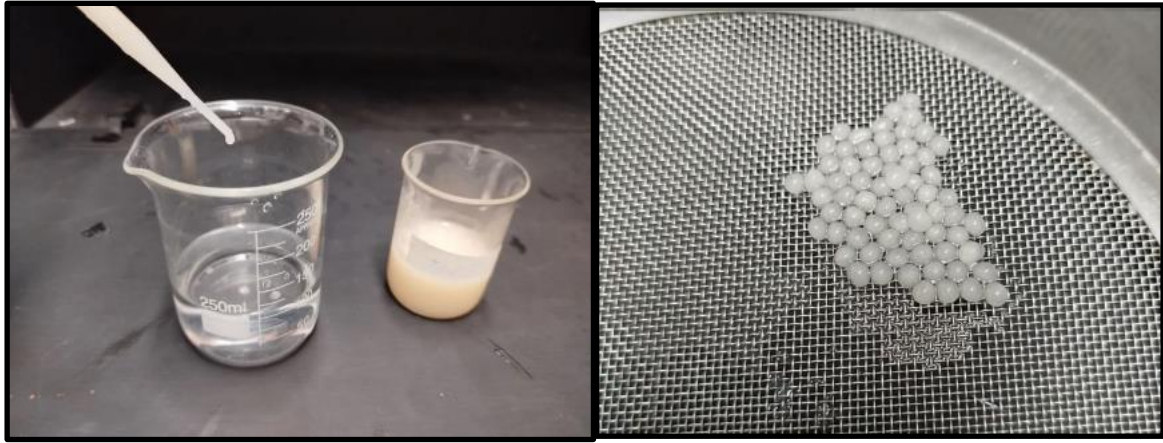


Figura 52. Emulsão 2 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação.

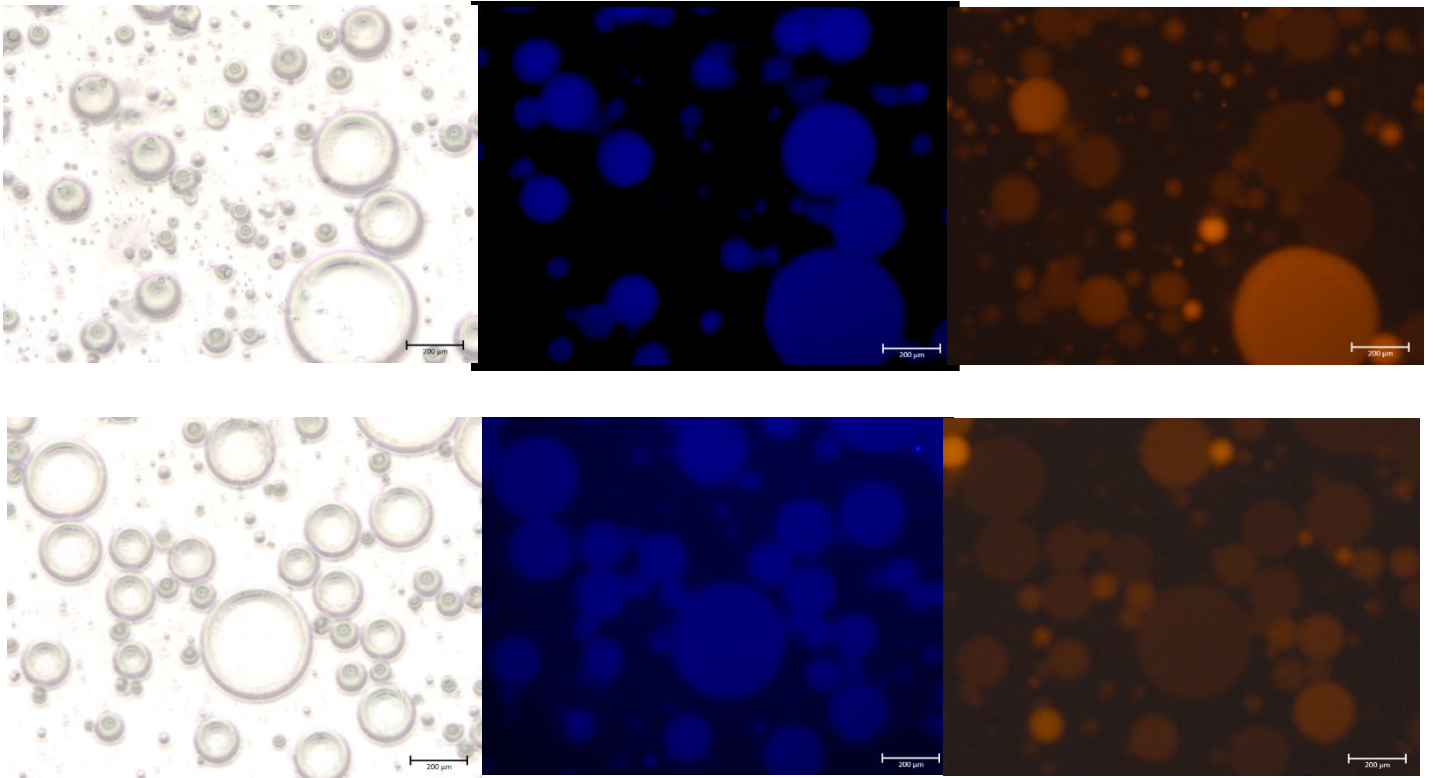


Figura 53. Microscopia Óptica de Fluorescência da Emulsão 2. Calcofluor branco utilizado como corante para carboidratos (pectina) e Vermelho do Nilo utilizado como corante para fase óleo. Aumento de 50x (traço – 200 µm).

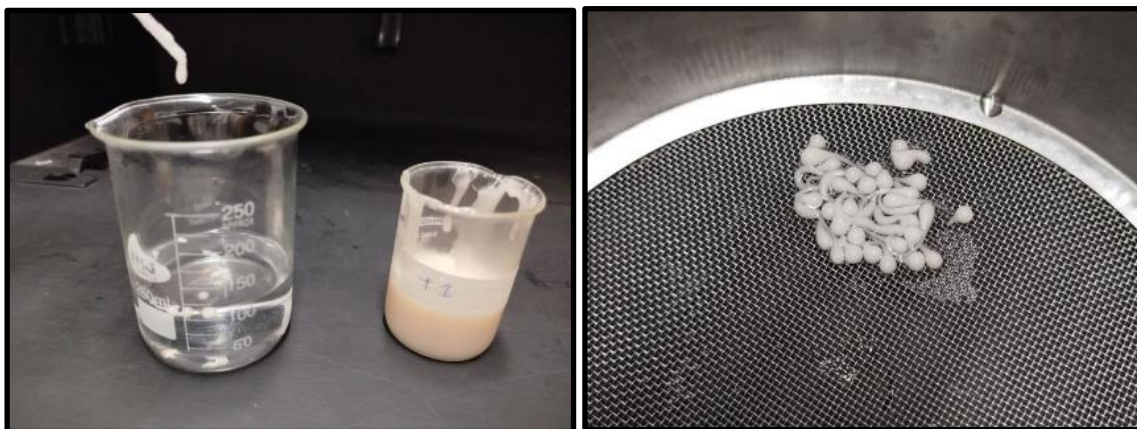


Figura 54. Emulsão 3 - Foto do estudo da estabilidade da emulsão e poder de gelificação.

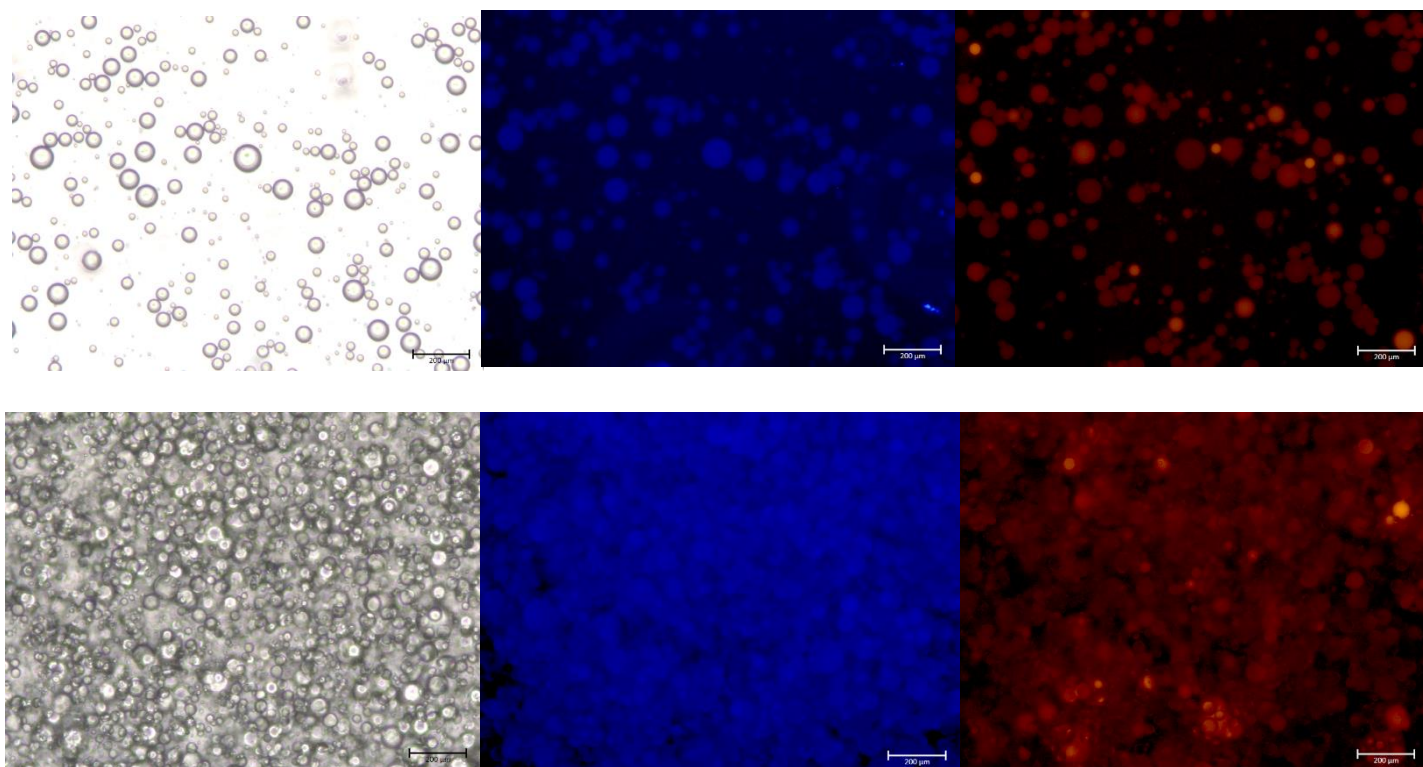


Figura 55. Microscopia Óptica de Fluorescência da Emulsão 3. Calcofluor branco utilizado como corante para carboidratos (pectina) e Vermelho do Nilo utilizado como corante para fase óleo. Aumento de 50x (traço – 200 µm).

9. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Os óleos essenciais que apresentaram maior inibição no teste *in vitro* foram o Capim-Limão e o Orégano. O teste foi realizado aplicando os óleos essenciais em poços equidistantes e medindo o diâmetro de crescimento do micélio. O óleo essencial não entrou em contato direto com o microrganismo, sendo possivelmente um efeito de substâncias voláteis. Após esse teste, os demais ensaios foram realizados apenas usando o Capim-Limão e o Orégano. Após sucessivas análises, definiu-se que os ensaios com os óleos essenciais diluídos no meio também seriam necessários para os demais óleos (Cravo, Tomilho e Citronela) para verificar se as substâncias diluídas no meio apresentam outro nível de toxicidade diferente daquele avaliado nos poços (volatilidade). Estudos conduzidos por Tyagi e Malik (2011) evidenciaram que o óleo essencial de capim-limão apresenta elevada atividade antifúngica em fase vapor, sendo capaz de promover inibição significativa do crescimento micelial de diversos fitopatógenos, inclusive espécies do gênero *Phytophthora*. Da mesma forma, Pinto et al. (2006) observaram que o óleo essencial de orégano exerce potente efeito antifúngico por volatilização, provocando danos severos à integridade da membrana plasmática, extravasamento citoplasmático e colapso celular. Esses achados corroboram fortemente com os resultados obtidos neste trabalho, validando a hipótese de que a atividade antimicrobiana desses óleos está diretamente relacionada à sua capacidade de liberação de compostos voláteis biologicamente ativos.

Os ensaios utilizando os óleos essenciais de Orégano e Capim-Limão permitiram a construção da equação da reta de Inibição de *P. parasitica* e determinar o valor da DL50 e DL100 para Orégano (0,00547%; 0,02%) e Capim-Limão (0,02166%; 0,05%). Pitarokili et al. (2003) observaram valores de DL50 variando entre 0,003% e 0,01% para o óleo essencial de orégano contra oomicetos, atribuindo essa elevada toxicidade principalmente à ação do carvacrol, capaz de desestabilizar a bicamada lipídica da membrana celular e comprometer a homeostase intracelular. De modo semelhante, Singh et al. (2010) relataram valores de DL100 entre 0,04% e 0,1% para o óleo essencial de capim-limão, resultados altamente compatíveis com os obtidos neste estudo. Essa convergência de dados reforça a robustez metodológica dos ensaios conduzidos e evidencia o elevado potencial desses óleos essenciais como agentes biofungicidas no controle de *P. parasitica*.

Os estudos envolvendo o β -sitosterol permitiram avanços significativos na compreensão de suas funcionalidades no desenvolvimento e na biologia de *Phytophthora parasitica*. Observou-se que, na presença de β -sitoesterol, o patógeno apresentou otimização do crescimento micelial, caracterizada por maior biomassa fúngica, concomitantemente a uma redução na formação de esporângios durante o cultivo em meio nutritivo. Esses resultados estão em estreita concordância com dados previamente reportados na literatura (Hendrix 1970; Elliott, 1983). A percepção do β -sitoesterol no meio de cultivo modulou o balanço entre crescimento vegetativo e reprodução assexuada, favorecendo predominantemente a expansão micelial. Entretanto, micélios previamente cultivados na presença de β -sitoesterol apresentaram maior capacidade de formação de esporângios quando submetidos à condição de estresse nutricional, representada

pela transferência para água destilada autoclavada. Entre as concentrações avaliadas, 0,1% (v/v) de β -sitosterol adicionado ao meio líquido durante o crescimento micelial foi a concentração que mais induziu a esporulação subsequente, evidenciando um efeito dose-dependente.

Elliott (1983) demonstrou que a suplementação com β -sitosterol estimula o crescimento vegetativo, ao mesmo tempo em que reprime temporariamente a esporulação sob condições nutricionais favoráveis. Hendrix (1970) reforçou esse conceito ao comprovar que esteróis atuam como reguladores metabólicos capazes de modular o balanço entre crescimento vegetativo e reprodução assexuada. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho corroboram o papel fisiológico central do β -sitosterol na regulação do ciclo de vida de *P. parasitica*. Esse comportamento está em consonância com observações de Elliott (1983), que demonstrou que a presença prévia de esteróis potencializa a resposta esporulatória quando o patógeno é exposto à privação nutricional. Tal resposta sugere que o β -sitosterol atua não apenas como componente estrutural de membranas, mas também como sinalizador metabólico envolvido na ativação dos programas de diferenciação celular em *Phytophthora*.

Adicionalmente, verificou-se que micélios cultivados na presença de β -sitosterol apresentaram redução significativa no tempo necessário para a formação, maturação e liberação de zoósporos quando submetidos à ausência de nutrientes. Enquanto, nos tratamentos sem β -sitosterol, esse processo ocorreu entre 20 e 25 dias, nos tratamentos com β -sitosterol esse intervalo foi reduzido para aproximadamente 10 dias, indicando aceleração dos eventos do ciclo assexuado. Esses dados corroboram observações clássicas de Elliott (1983) e Nes e McKean (1977), que evidenciaram que a presença de esteróis acelera os processos de biogênese dos esporângios, maturação celular e liberação de zoósporos, principalmente por meio da modulação da fluidez da membrana plasmática e da ativação de vias metabólicas associadas à reprodução assexuada. Dessa forma, os resultados indicam que o β -sitosterol atua como um fator-chave na aceleração do ciclo assexuado de *P. parasitica*. Esses resultados sugerem que o β -sitosterol potencializa os mecanismos envolvidos na liberação de zoósporos pelos esporângios, tornando essa fase mais eficiente. Consequentemente, é plausível inferir que processos associados à patogenicidade também possam ser intensificados, uma vez que a produção e a liberação acelerada de zoósporos representam etapas críticas no estabelecimento da infecção na planta hospedeira. A literatura ressalta de forma consistente que a eficiência e a velocidade da liberação de zoósporos estão intimamente relacionadas ao sucesso da infecção em plantas hospedeiras. Judelson e Blanco (2005) observaram que isolados de *Phytophthora* com maior capacidade de produção precoce de zoósporos apresentam maior agressividade, maior severidade dos sintomas e maior eficiência de colonização dos tecidos vegetais. Nesse contexto, os resultados deste trabalho sugerem que o β -sitosterol pode potencializar indiretamente a virulência de *P. parasitica*, ao tornar o ciclo infeccioso mais rápido e eficiente.

Sobre os genes *PpPR-1a, b, c, d* é possível concluir que esses genes são expressos durante a infecção de *Phytophthora parasitica* em *Citrus*. Com base nos resultados desse ensaio, o padrão de expressão mostra

que os RNAs B e C são mais expressos ao final da infecção e os RNAs A e D são mais expressas no início. Porém considerando os métodos realizados para essa infecção, será necessário repetir esse experimento ajustando alguns detalhes da infecção, controle na contagem de zoósporos e tamanho das plantas experimentais. Esse padrão é compatível com dados da literatura que indicam uma regulação temporal final da expressão de RNAs que expressam proteínas efetoras durante o processo infeccioso. Jiang (2023) demonstrou que o gene de *P. capsici* *PsCAP1*, pertencente à Superfamília CAP/PR-1 é expresso durante a infecção e é uma proteína efetora de patogenicidade, através da potencialização de HR/necrose. Assim, os resultados obtidos neste trabalho reforçam o papel funcional desses genes como efetores envolvidos em diferentes etapas da patogênese.

O contato dos óleos essenciais com micélios de *P. parasitica* mostrou os principais efeitos dos óleos essenciais no micélio: enfraquecimento, ruptura, sinais de toxicidade nas extremidades. O aumento da concentração de óleos essenciais não mostrou aumento na severidade dos sintomas através dos efeitos pela observação com microscopia óptica. Possivelmente exista uma cinética de degradação e as maiores concentrações do OE degradem mais rápido o micélio, porém sem sinais visíveis. A análise do RNA de micélio em contato com os óleos essenciais comprova que após 3 horas em contato com os óleos essenciais é possível verificar um possível efeito de degradação do RNA e essa mesma concentração de óleo essencial quando deixada em contato por 32 horas é capaz de degradar todo o RNA ou inibir a sua expressão. Não foi possível analisar por RT-qPCR as amostras de 32 horas por não haver material íntegro para análise. Esses achados estão de acordo com os mecanismos de ação descritos para óleos essenciais na literatura. Bakkali et al. (2008) visualizaram que compostos voláteis presentes em óleos essenciais induzem estresse oxidativo, peroxidação lipídica, desorganização mitocondrial e degradação de macromoléculas celulares, incluindo RNA. De forma semelhante, Nazzaro et al. (2013) relataram que o contato prolongado com óleos essenciais resulta em colapso metabólico irreversível, caracterizado por inibição da transcrição e degradação completa do material genético. Assim, os resultados obtidos confirmam que os óleos essenciais de capim-limão e orégano promovem efeitos letais significantes sobre *P. parasitica*, interferindo diretamente nos mecanismos celulares e moleculares essenciais à sobrevivência do patógeno. Curiosamente, a análise das amostras com 3 horas de contato com os óleos essenciais em comparação com os controles confirma que os genes *PpPR-1* avaliados não são expressos na fase micélios + esporângios e o contato do micélio + esporângios com os óleos essenciais de Capim-Limão e Orégano não altera esse padrão. Portanto, podemos inferir que esses genes podem ser expressos somente no momento da infecção, aumentando seu potencial como proteínas efetoras de patogenicidade.

10. ENSAIOS EM ANDAMENTO E PERSPECTIVAS

Experimentos de Infecção de *Phytophthora parasitica* em tubos falcon.

Serão realizados novos experimentos de infecção. Porém, desta vez, após a liberação dos zoósporos, estes serão centrifugados para concentrá-los. O número de zoósporos em suspensão será determinado utilizando a câmara de Neubauer. Os tubos Falcon receberão a mesma quantidade de zoósporos (Dálio et al., 2018). Plantas de *Citrus sunki* que foram germinadas em substrato estéril serão utilizadas após 3 meses. O substrato será cuidadosamente removido e as plantas serão transferidas para um tubo contendo 30 mL de água destilada estéril, com os zoósporos adicionados igualmente entre os tubos. Os tubos serão selados com Parafilm para evitar perda de água por evaporação. As plantas serão incubadas em câmaras de crescimento a 20°C sob um fotoperíodo de 12 h. Diariamente, as plantas serão monitoradas quanto à necrose radicular, crescimento de micélio visível na superfície da raiz, murchamento das folhas, mortalidade e absorção de água. Adicionalmente, as plantas também serão colhidas em 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h e 96 horas após a infecção e utilizadas para extração de DNA e RNA. A expressão dos genes *PpPR-1A* e *D* será quantificada através da RT-qPCR, os danos nos tecidos (raízes e folhas) também serão analisados ao longo do tempo (Dálio et al., 2018).

Avaliações da eficiência e testes de liberação dos microencapsulados

As micropartículas serão avaliadas em relação ao seu resíduo seco, correspondente ao peso das micropartículas após a remoção da água. Esse parâmetro é determinado pela razão entre o peso seco das micropartículas (após liofilização) e o peso das micropartículas hidratadas (após a etapa de reticulação) e é expresso em porcentagem (% m/m). Outra medida importante nesse aspecto é a capacidade de rehidratação, que está relacionada com a habilidade dos microencapsulados de adsorver água e recuperar a sua forma inicial. Essa medida será realizada adicionando 30 mg de microencapsulados secos em 10 mL de água destilada. As amostras serão armazenadas durante 72 h. Após este período de tempo os microencapsulados serão analisados novamente por microscopia óptica para análise morfológica e depois serão pesados para avaliar o ganho de peso (Cuma, 2018).

O perfil de liberação dos microencapsulados será avaliado, utilizando três tratamentos de solo + água autoclavada nas proporções: 1:3, 2:2 e 3:1. As partículas serão pesadas antes e depois do tratamento.

1. Trinta (30) mg dos microencapsulados secos serão pesados e adicionados em 40 g totais de solo e água autoclavado.
2. As pesagens serão realizadas a 6h, 24h, 48h, 72h e 96h e 168 horas.

11. ANEXO

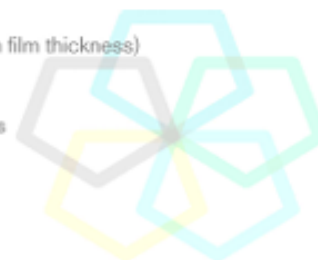


Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising
quality control for your products.

Customer : doTERRA International
Lot Number : 2231188
Date Filled : 04/28/2023

Column : ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)
Instrument : Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
Carrier gas : Helium 80 psi
Temperature ramp : 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius
Split ratio : 30:1
Sample preparation : 5%w/v solution with Dichloromethane.



Comments:

The analysis of this Origanum lot revealed no contaminants or adulteration.
The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of Origanum vulgare.

Analysied by : Ambika Poudel
Reviewed by : Dr. Prabodh Satyal



© Copyright 2023 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

Peak Report

Peak#	R.Time	Name	Area%
1	5.877	Methyl alpha-methyl butyrate	0.04
2	11.176	alpha-Thujene	0.44
3	11.550	alpha-Pinene	0.62
4	12.381	Camphene	0.28
5	13.855	beta-Pinene	0.09
6	13.956	1-Octen-3-ol	0.11
7	14.498	Myrcene	1.44
8	15.472	alpha-Phellandrene	0.22
9	15.611	delta-3-Carene	0.08
10	16.119	alpha-Terpinene	1.35
11	16.620	para-Cymene	3.97
12	16.863	Limonene	0.21
13	16.950	beta-Phellandrene	0.21
14	17.000	1,8-Cineole	0.03
15	17.258	cis-beta-Ocimene	0.03
16	17.914	trans-beta-Ocimene	0.06
17	18.713	gamma-Terpinene	5.03
18	19.409	cis-Sabinene hydrate	0.23
19	20.386	Terpinolene	0.18
20	20.701	para-Cymenene	0.03
21	21.459	Linalool	5.70
22	21.600	Hotrienol	0.08
23	22.982	cis-para-Menth-2-en-1-ol	0.03
24	23.133	alpha-Campholenal	0.03
25	26.159	Borneol	1.19
26	26.764	Terpinen-4-ol	0.83
27	28.094	alpha-Terpineol	0.07
28	30.693	Carvacrol methyl ether	0.12
29	31.764	Carvone	0.22
30	33.320	Carvenone	0.05
31	34.248	Thymol	1.55
32	35.408	Carvacrol	69.99
33	35.957	Methyl non-8-enoate	0.10
34	36.413	tert-Butyl-para-benzoquinone	0.04
35	38.227	Eugenol	0.02
36	38.695	Neryl acetate	0.02
37	39.057	Carvacrol acetate	0.15
38	39.698	alpha-Copaene	0.02
39	39.951	Geranyl acetate	0.04
40	40.208	beta-Bourbonene	0.03
41	41.351	Methyl eugenol	0.05
42	42.472	beta-Caryophyllene	1.30
43	43.341	trans-alpha-Bergamotene	0.05
44	43.641	Aromadendrene	0.23
45	44.677	alpha-Humulene	0.05
46	44.952	allo-Aromadendrene	0.02
47	45.915	trans-Cadina-1(6),4-diene	0.02
48	46.900	Viridiflorene	0.12
49	47.991	beta-Bisabolene	2.04
50	48.242	gamma-Cadinene	0.14
51	48.561	delta-Cadinene	0.07
52	48.899	beta-Sesquiphellandrene	0.02
53	49.892	trans-alpha-Bisabolene	0.03
54	51.971	Spathulenol	0.16
55	52.258	Caryophyllene oxide	0.33
56	54.191	1,10-Di-epi-cubanol	0.02
57	55.720	epi-alpha-Cadinol	0.17
58	56.462	alpha-Cadinol	0.03
59	68.995	Oregano sesquiterpenoid 1	0.03
60	70.211	Oregano sesquiterpenoid 2	0.16

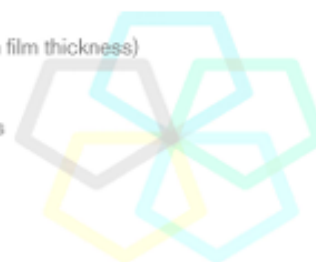


Aromatic Plant Research Center

We provide uncompromising
quality control for your products.

Customer : doTERRA International
Lot Number : 233223
Date Filled : 11/18/2023

Column : ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)
Instrument : Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra
Carrier gas : Helium 80 psi
Temperature ramp : 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees celsius
Split ratio : 30:1
Sample preparation : 5%w/v solution with Dichloromethane.



Comments:

The analysis of this Lemongrass lot revealed no contaminants or adulteration.
The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of *Cymbopogon flexuosus*.

Analysied by : Ambika Poudel
Reviewed by : Dr. Prabodh Satyal



© Copyright 2023 Aromatic Plant Research Center. All rights reserved. Any publishing, copying, use, dissemination, or distribution of this report, including online, without the express written permission of Aromatic Plant Research Center is strictly prohibited.

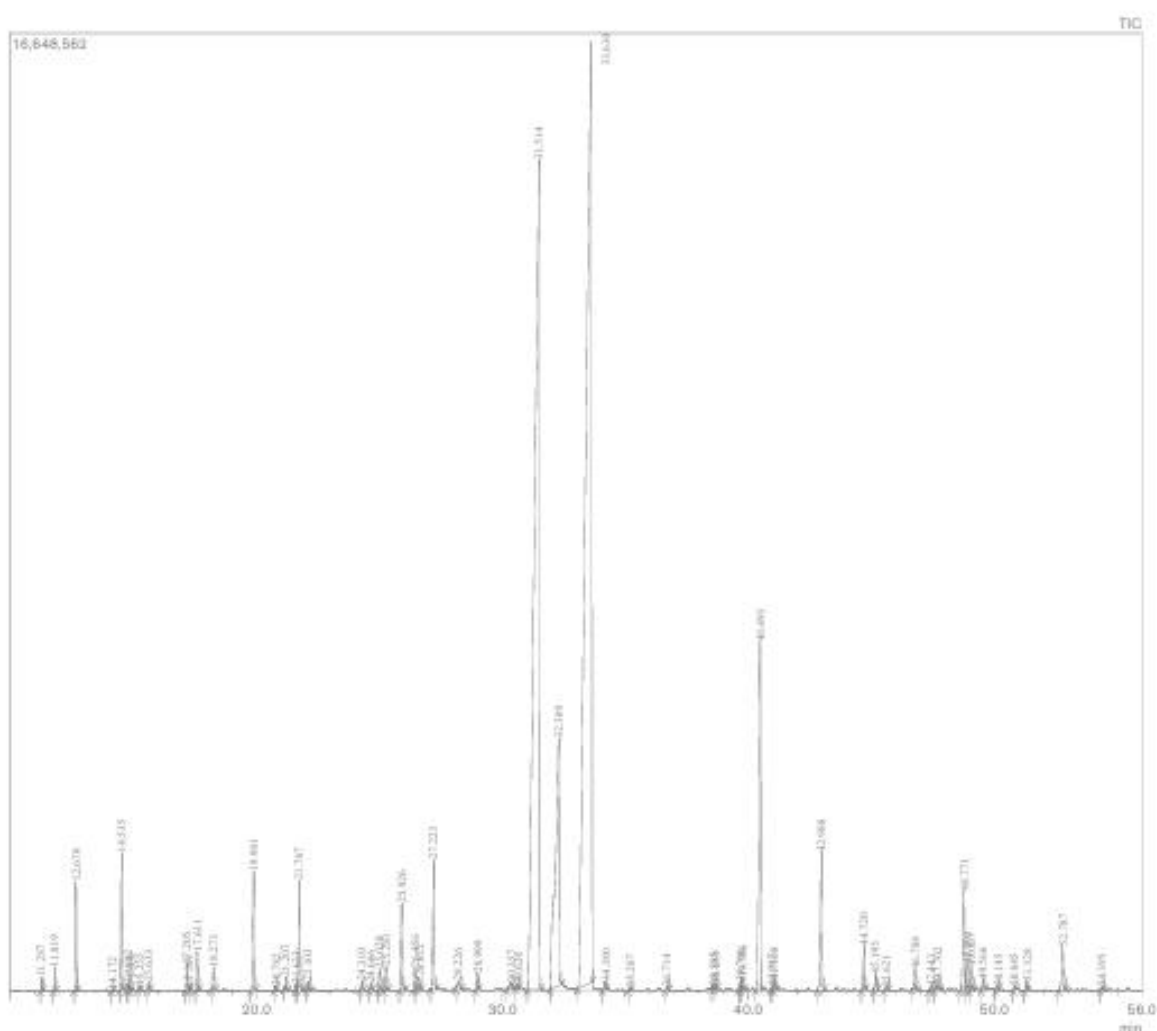
Lemongrass Essential Oil

Customer : doTERRA International

Lot Number : 233223

Date Filled : 11/18/2023

Chromatogram



Peak Report

Peak#	R.Time	Name	Area%
1	11.287	Tricyclene	0.10
2	11.819	alpha-Pinene	0.17
3	12.679	Camphene	0.85
4	14.172	beta-Pinene	0.01
5	14.535	6-Methyl-5-hepten-2-one	1.14
6	14.802	Myrcene	0.07
7	14.860	Dehydro-1,8-cineole	0.02
8	15.255	trans-Dehydroxy linalool oxide	0.03
9	15.633	n-Octanal	0.07
10	17.205	Limonene	0.22
11	17.301	beta-Phellandrene	0.02
12	17.611	cis-beta-Ocimene	0.34
13	18.273	trans-beta-Ocimene	0.20
14	19.901	4-Nonanone	1.15
15	20.782	Terpinolene	0.04
16	21.207	Rosefuran	0.10
17	21.633	Perillene	0.06
18	21.767	Linalool	1.15
19	22.103	alpha-Pinene oxide	0.09
20	24.310	Epiphocitral A	0.09
21	24.666	exo-Isocitral	0.08
22	25.020	trans-Chrysanthal	0.22
23	25.281	Citronellal	0.24
24	25.926	cis-Isocitral	0.93
25	26.456	Rosefuran epoxide	0.23
26	26.612	Borneol	0.16
27	27.223	trans-Isocitral	1.49
28	28.226	alpha-Terpineol	0.13
29	28.999	n-Decanal	0.18
30	30.357	Nerol	0.13
31	30.624	Citronellol	0.05
32	31.514	Neral	31.13
33	32.309	Geraniol	7.41
34	33.630	Geranial	40.74
35	34.180	trans-Carvone oxide	0.09
36	35.207	Geranyl formate	0.03
37	36.714	Methyl geranate	0.04
38	38.565	Citronellyl acetate	0.05
39	38.659	Neric acid	0.06
40	39.700	Cyclosativene	0.09
41	39.766	alpha-Ylangene	0.14
42	40.493	Geranyl acetate	4.71
43	40.987	beta-Cubebene	0.05
44	41.108	beta-Elemene	0.13
45	42.988	beta-Caryophyllene	1.70
46	44.720	trans-Isoeugenol	0.50
47	45.195	alpha-Humulene	0.19
48	45.621	cis-Muurolo-4(14),5-diene	0.04
49	46.788	Germacrene D	0.23
50	47.443	trans-Muurolo-4(14),5-diene	0.04
51	47.702	epi-Cubebol	0.16
52	48.771	gamma-Cadinene	1.17
53	48.892	Cubebol	0.32
54	49.067	delta-Cadinene	0.29
55	49.566	trans-gamma-Bisabolene	0.15
56	50.145	alpha-Cadinene	0.05
57	50.845	alpha-Elemol	0.04
58	51.328	Geranyl butyrate	0.10
59	52.787	Caryophyllene oxide	0.56
60	54.395	Humulene epoxide II	0.04
			100.00

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcazar-Fuoli, L. Mellado, E. (2013) Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Front. Microbiol.** 3, p. 439, 10.3389/fmicb.2012.00439
- Ali S, Bakkeren G. (2011) Fungal and oomycete effectors strategies to subdue a host. **J Plant Pathol.** 33(4):425–446. doi:10.1080/07060661.2011.625448
- Avrova AO, Venter E, Birch PR, Whisson SC. (2003) Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. **Fungal Genetics and Biology** 40: 4–14.
- BakkaliI, F. et al. (2008) Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology.** <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H. et al. (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proc Natl Acad Sci**;110:E1621–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Begum, R.; Aziz, M.G.; Yusof, Y.A.; Saifullah, M.; Uddin, M.B. (2021) Evaluation of gelation properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) waste pectin. **Carbohydr. Polym. Technol. Appl.**, 2, 100160. (<https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100160>).
- Biasi, L. A., & Deschamps, C. (2009). Produção de plantas aromáticas no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 11, 230–238. <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/4mWjdd5Jc7MR8Hzd4qnv7qt>
- Bircher U, Hohl HR. (1997) Environmental signalling during induction of appressorium formation in *Phytophthora*. **Mycological Research** 101: 395–402.
- Bircher U, Hohl HR. (1999) A role for calcium in appressorium induction in *Phytophthora palmivora*. **Botanica Helvetica** 109: 55–65.
- Blank, A. F., et al. (2008). Influence of cultivation conditions on growth and essential oil content of oregano in Brazil. **Horticultura Brasileira**, 26, 208–213. <https://www.scielo.br/j/hb/a/kx9sjCLp66bN7nR8YFZs7WC>
- Borsari, A. Redução de custos, aumento da produtividade e proteção da natureza. **Total Agro: A Granja**, ed. 899, p. 20–24, 2023.
- Boubsi F, Hoff G, Arguelles Arias A. et al. (2023) Pectic homogalacturonan sensed by bacillus acts as host associated cue to promote establishment and persistence in the rhizosphere. **iScience**; 26:107925. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107925>
- Burey, P., Bhandari, B. R, Howes, T., Gidley, M. J. (2008). Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48, 361–377.
- Capell-Hattam, I. M., Brown, A, J. (2020) Sterol evolution: cholesterol synthesis in animals is less a required trait than an acquired taste **Curr. Biol.**, 30 (15), pp. R886–R888 (<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.014>).
- Chen X, Shen G, Wang Y, Zheng X, Wang Y. (2007) Identification of *Phytophthora sojae* genes upregulated during the early stage of soybean infection. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) **Microbiology Letters** 269: 280–288.
- Chen, J.; Liu, W.; Liu, C.-M.; Li, T.; Liang, R.-H.; Luo, S.-J. (2015) Pectin modifications: A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 55, 1684–1698. (<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.718722>).
- Chi J, Song S, Zhang H, Liu Y, Zhao H, Dong L. (2021) Research on the Mechanism of Soybean Resistance to *Phytophthora* Infection Using Machine Learning Methods. **Front Genet.** Feb 11;12:634635. doi: 10.3389/fgene.2021.634635. Erratum in: *Front Genet.* 2022 Oct 24;13:1062928. PMID: 33679898; PMCID: PMC7928311.
- Ciriminna, R.; Fidelio, G. D.; Scurto, A. M.; Pagliaro, M. (2015) Pectin: A new perspective from the *citrus* biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 4, p. 368–377.
- Cline, et al., E. T. A (2008) Synopsis of *Phytophthora* with Accurate Scientific Names, Host Range, and Geographic Distribution. **Plant Health Progress.**
- CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard- second edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute** (Vol. 28)PA: Wayne.
- CLSI (2015a). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard— **Clinical and Laboratory Standards Institute** Tenth edition. Vol. 35PA: Wayne.
- CLSI (2015b). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—Twelfth edition. **Clinical and laboratory standards institute.** PA: Wayne.
- Corona-Hernandez, R. I., Parrilla, E. A., LizardiMendoza, J., Islas-Rubio, A. R., Rosa, L. A., Wall-Medrano, A. (2013). Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 12, 614–628.
- Cox, S.D., et al. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, 88(1), 170–175.
- CROPLIFE BRASIL. Biodefensivos, cada vez mais presentes no campo. São Paulo, 2023. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/biodefensivos-cada-vez-mais-presentes-nocampo/>>. Acesso em: 3 nov. 2023.

- CROPLIFE BRASIL. Evolução da agricultura brasileira e inovação no desenvolvimento de defensivos. São Paulo, 2021. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/defensivosquimicos/evolucao-da-agricultura-brasileira-e-inovacao-nodesenvolvimento-de-defensivos/>>. Acesso em: 1 nov. 2023
- D'Antuono, L. F., Galletti, G. C., & Bocchini, P. (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare*. **Industrial Crops and Products**, 11, 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00048-1)
- Dalio RJD, Máximo HJ, Oliveira TS, Azevedo TM, Felizatti HL, Campos MA, Machado MA. Molecular (2018) Basis of *Citrus sunki* Susceptibility and *Poncirus trifoliata* Resistance Upon *Phytophthora parasitica* Attack. **Mol Plant Microbe Interact**. Mar;31(3):386-398. doi: 10.1094/MPMI-05-17-0112-FI. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29125028.
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, 61, 452-462.
- Der, C. Courty, P.-E. Recorbet, G. Wipf, D. Simon-Plas, F. Gerbeau-Pissot, P. (2024) Sterols, pleiotropic players in plant–microbe interactions **Trends Plant Sci**. 10.1016/j.tplants.2024.03.002
- Deweer, C., Sahmer, K., & Muchembled, J. (2023). Atividades anti-oomicetos de óleos essenciais e seus principais compostos em *Phytophthora infestans*. **Environmental Science and Pollution Research**, 30(51), 110240-110250.
- Du, Y. Fu, X. Chu, Y. Wu, P. Liu, Y. Ma, L. Tian, H. Zhu, B. (2022) Biosynthesis and the roles of plant sterols in development and stress responses **Int. J. Mol. Sci.**, 23 (4), p. 2332, 10.3390/ijms23042332
- Dudai, N., et al. (2004). Essential oil as a chemotaxonomic marker in the genus *Origanum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.09.012>
- Ebstrup T, Saalbach G, Egsgaard H. (2005) A proteomics study of in vitro cyst germination and appressoria formation in *Phytophthora infestans*. **Proteomics** 5: 2839–2848.
- Eccersall, S. Vinson, L.S. McDougal, R. Meisrimler C.N. (2003) *Phytophthora pluvialis* culture cultivation, maintenance, ad detached needle assay protocol. **Plos One** dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kqdg3p9d7125/v1
- Elliott, C. G. (1983) Sterol requirements for growth and sporulation of *Phytophthora*. **Phytopathology**, <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-1412>
- Erwin DC, Ribeiro OK. (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, MN,USA:**American Phytopathological Society**.
- Fareez, I. M., Lim, S. M., Mishra, R. K., Ramasamy, K. (2015). Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**, 72, 1419–1428
- Fellbrich G, Romanski A, Varet A, Blume B, Brunner F, Engelhardt S, Felix G, Kemmerling B, Krzymowska M, Nürnberger T. (2002) NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and arabidopsis. **Plant J**. 32 (3):375–390. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01454.x
- Flutto, L. (2003) Pectin: Properties and determination. In **Encyclopedia of food Sciences and Nutrition**, 2nd ed.; Caballero, B., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, pp. 4440–4449. (<https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00901-9>).
- Franck Panabières et al. (2016) *Phytophthora nicotianae* diseases worldwide: new knowledge of a long-recognised pathogen. **HAL** (Le Centre pour la Communication Scientifique Directe), 12 maio.
- Gacesa, P. (1988). Alginates **Carbohydrate Polymers**, 8, 161-182.
- Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, Rickauer M, Esquerré-Tugayé M-T BA. (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. **J Cell Sci**. 115(23):4565–4575. doi:10.1242/jcs.00138
- Gawkowska, D. Cybulska J. Zdunek, A. (2018) Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: a Review. **Polymers** 2018, 10(7), 762; (<https://doi.org/10.3390/polym10070762>).
- Gilsenan, P.; Richardson, R.; Morris, E. (2000) Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. **Carbohydr. Polym.** 41, 339–349. ([https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00119-8)).
- Glare, T. J.; Caradus, W.; Gelernter, T.; Jackson, T.; Keyhani, N.; Kohl, J.; Marrone P.; Morin, L.; E Stewart, A. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250–258, 2012.
- Gombotz, W. R. & Wee, S. F. (1998). Protein release from alginate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 31, 67-285.
- Goodwin, S.B. The Population Genetics of *Phytophthora parasitica*. Symposium of Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens. **USDA-ARS**, Department of Botany and Plant Pathology, 1155 Lilly Hall, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-1155. Disponível em <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/50200500/PopGen.pdf> Acesso 22/01/2026
- Graham JH, Menge JL. (2000) *Phytophthora* induces disease In: Timmer LW, Garnesny SM, Graham JH, editors) “Compendium of *Citrus* diseases”, **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN; p. 12-15.
- Gregory IN, Cunningham NA. (2016) The judgement of God on an indolent and unself-reliant people?: the impact of the Great Irish Famine on Ireland’s religious demography. **J Hist Geogr**. 51:76–87. <https://doi.org/10.1016/j.jhg.2015.07.001>

- Grenville-Briggs LJ, Anderson VL, Fugelstad J, Avrova AO, Bouzenzana J, Williams A, Wawra S, Whisson SC, Birch PR, Bulone V et al. (2008) Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. **Plant Cell** 20: 720–738.
- Grenville-Briggs LJ, Avrova AO, Bruce CR, Williams A, Whisson SC, Birch PR, van West P. (2005) Elevated amino acid biosynthesis in *Phytophthora infestans* during appressorium formation and potato infection. **Fungal Genetics and Biology** 42: 244–256.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Efeitos antifúngicos do óleo de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) e seus componentes em *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 53(6), 1081-1085.
- Hardham, A. R.; Shan, W. (2009) Cellular and molecular biology of *Phytophthora*–plant interactions. In: **Plant Relationships**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 2-27.
- Hardham, A.R. Blackman, L.M. (2018) *Phytophthora cinnamomi* **Mol. Plant Pathol.**, 19 (2) pp. 260-285
- Harholt, J.; Suttangkakul, A.; Vibe Scheller, H. (2010) Biosynthesis of pectin. **Plant Physiol.** 153, 384–395 (<https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>).
- Hendrix, J. W. (1970) Sterols in growth and reproduction of *Phytophthora*. **Phytopathology**, <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-124>
- Hijaz, F. Nehela, Y. Killiny (2016) Possible role of plant volatiles in tolerance against huanglongbing in *citrus*, **Plant Signaling & Behavior**, 11:3, e1138193, DOI:10.1080/15592324.2016.1138193
- Hou S, Liu Z, Shen H. et al. (2019) Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Front Plant Sci**;10:646. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>
- Humerez-Flores, J.N.; Verkempinck, S.H.; De Bie, M.; Kyomugasho, C.; Van Loey, A.M.; Moldenaers, P.; Hendrickx, M.E. (2022) Understanding the impact of diverse structural properties of homogalacturonan rich *citrus* pectin-derived compounds on their emulsifying and emulsion stabilizing potential. **Food Hydrocoll.** 125, 107343. (<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107343>).
- Huong, L. T.; et al. (2024) Chemical composition, antimicrobial and larvicidal activities of essential oils of two *Syzygium* species from Vietnam. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e270967, p. 1-9.
- Hwang, S.M.; Lee, K.; Im, S.T.; Go, E.J.; Kim, Y.H.; Park, C.K. (2020) Co-Application of Eugenol and QX-314 Elicits the Prolonged Blockade of Voltage-Gated Sodium Channels in Nociceptive Trigeminal Ganglion Neurons. **Biomolecules**, 10, 1513.
- IHS MARKIT. **Annual new product introductions: Biological vs conventional**. New York, 2021. Disponível em: <<https://ihsmarkit.com/research-analysis/biologicalsinnovation.html>>. Acesso em: 8 out. 2024
- Islam, M. T. Hussain, H. Russo, R. Chambery, A. Amoresano, A. Schallmey, A. Oßwald, W. Nadiminti, P.P. Cahill, D. (2019) Functional analysis of elicitors and identification of cell wall proteins in *Phytophthora cinnamomi* **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 107 (2019), pp. 21-32, 10.1016/j.pmp.2019.04.003
- Islam, S.S.; Al-Sharif, I.; Sultan, A.; Al-mazrou, A.; Remmal, A.; Aboussekhra, A. (2018) Eugenol potentiates cisplatin anti-cancer activity through inhibition of ALDH-positive breast cancer stem cells and the NF-κB signaling pathway. **Molecular Carcinogenesis**. 2018, 57, 333–346.
- Jiang, H. et al, (2023). The CAP superfamily protein PsCAP1 secreted by *Phytophthora* triggers immune responses in *Nicotiana benthamiana* through a leucine-rich repeat receptor-like protein. **New Phytologist** 240(2):784-801
- Jiang, R.-H. & Tyler, B. M. (2012). Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, 50, 295–318. (contexto sobre efetores RxLR).
- Jones JD, Dangl JL. (2006) The plant immune system. **Nature**. 444(7117):323–329. doi:10.1038/nature05286
- Judelson HS, Ah-Fong AM, Aux G, Avrova AO, Bruce C, Cakir C, da Cunha L, Grenville-Briggs L, Latijnhouwers M, Ligterink W et al. (2008) Gene expression profiling during asexual development of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* reveals a highly dynamic transcriptome. **Molecular Plant Microbe Interactions** 21: 433–447.
- Juderlson, H.; Blanco, F. (2005) The spores of *Phytophthora*. **FEMS Microbiology Letters**, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.031>
- Kalemba, D.; Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**. 10, 813–829.
- Kamoun S, Klucher KM, Coffey MD, Tyler BM. (1993) A gene encoding A host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. **Mol Plant Microbe Interact.** 6(5):573–581. doi:10.1094/MPMI-6-573
- Kamoun S, van West P, Govers F. (1998) Quantification of late blight resistance of potato using transgenic *Phytophthora infestans* expressing β-glucuronidase. **Eur J Plant Pathol.** 104(5):521–525. doi:10.1023/A:1008698620906
- Kamoun S. (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annu Rev Phytopathol.** 44:41–60. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436
- Kanneganti, T. D., Huitema, E., Cakir, C. & Kamoun, S. (2006). Synergistic interactions of plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nep1-like protein PiNPP1.1 and INF1 elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 19, 854–863. (INF1 assay de controle).
- Kannwischer, M.E., Mitchell D.J. (1978) The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. **Phytopathology** 68: 1760-1765.

- Kazan, K. Gardiner, D.M. (2017) Targeting pathogen sterols: defence and counterdefence? **PLoS Pathog.**, 13 (5) Article e1006297, 10.1371/journal.ppat.1006297
- Kemen E, Gardiner A, Schultz-Larsen T, Kemen AC, Balmuth AL, Robert-Seilaniantz A, Bailey K, Holub E, Studholme DJ, MacLean D, et al. (2011) Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Biol.** 9(7):e1001094.doi:10.1371/journal.pbio.1001094
- Kharel, A. Islam, M.T. Rookes, J. Cahill, D. (2021) How to unravel the key functions of cryptic Oomycete elicitor proteins and their role in plant disease. **Plants**, 10 (6) (2021), p. 1201
- Khatib M, Lafitte C, Esquerré-Tugayé MT, Bottin A, Rickauer M. (2004) The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. **New Phytol.** 162 (2):501–510. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01043.x
- Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, 12, 357–360. (ferramenta usada para mapeamento).
- Kokkini, S., Karousou, R., & Lanaras, T. (2003). Essential oil composition of Greek oregano populations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1232–1238. <https://doi.org/10.1021/jf020921s>
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., & Lanaras, T. (1997). Autecology and essential oil variability of *Origanum vulgare* in Greece. **Biochemical Systematics and Ecology**, 25(6), 517–545. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00029-5)
- Kraemer R, Freytag S, Schmelzer E. (1997) In vitro formation of infection structures of *Phytophthora infestans* is associated with synthesis of stage specific polypeptides. **European Journal of Plant Pathology** 103: 43–53.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, 14, 737-743.
- Kroon, L. P. N. M. et al. (2012) The genus *Phytophthora* anno 2012. **Phytopathology**, 102, 4, 348-364.
- Lamour, K. H. et al. (2012) Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 25, 10, 1350-1360.
- Lamour, K.; et al., (2007) Oomycete genomics: new insights and future directions. **FEMS Microbiology Letters** 274(1): 1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00786.x
- Lara-Espinoza, C.; Carvajal-Millán, E.; Balandrán-Quintana, R.; López-Franco, Y.; Rascón-Chu, A. (2018) Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. **Molecules**, 23, 942. (<https://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/942>)
- Latinjnhouwers, M.; De Wit, P. J. G. M.; Govers, F. (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **Trends in Microbiology**, 11, 10, 462-469.
- Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G., & Park, I. K. (2008). Atividade antifúngica de óleos essenciais de Myrtaceae e seus componentes contra três fungos fitopatogênicos. **Flavor and Fragrance Journal**, 23(1), 23-28.
- Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, Raffaele S, Robideau GP, Thines M, Win J, et al. (2010) Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. **Genome Biol.** 11(7): R73. doi:10.1186/gb-2010-11-7-r73
- Li J, Peng C, Mao A. et al. (2024) An overview of microbial enzymatic approaches for pectin degradation. **Int J Biol Macromol**;254:127804. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127804>
- Li, R.-Y., Wu, X.-M., Yin, X.-H., Long, Y.-H. & Li, M. (2015). Naturally produced citral can significantly inhibit normal physiology and induce cytotoxicity on *Magnaporthe grisea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 118, 19–25.
- Li, R. Y.; Wu, X.M.; Yin, X.H.; Long, Y.H.; LI, M. (2015). Naturally produced citral can significantly inhibit normal physiology and induce cytotoxicity on *Magnaporthe grisea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 18:19-25.
- Lin, X., Wang, S.-M., de Rond, L., Bertolin, N., Wouters, R. H. M., Wouters, D. et al. (2020). Divergent evolution of PcF/SCR74 effectors in oomycetes is associated with distinct recognition patterns in solanaceous plants. **mBio**, 11, e00947-20.
- Lin, Y.H.; Xu, M.Y.; Hsu, C.C.; Damei, F.A.; Lee, H.C.; Tsai, W.L.; Hoang, C.V.; Chiang, Y.R.; Ma, L.S. (2023). *Ustilago maydis* PR-1-like protein has evolved two distinct domains for dual virulence activities. **Nature Communications**. 14(1):5755. doi: 10.1038/s41467-023-41459-4.
- Links MG, Holub E, Jiang RH, Sharpe AG, Hegedus D, Beynon E, Sillito D, Clarke WE, Uzuhashi S, Borhan MH. (2011) De novo sequence assembly of *Albugo candida* reveals a small genome relative to other biotrophic oomycetes. **BMC Genomics**. 12(1):503. doi:10.1186/1471-2164-12-503
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) **Methods**. 25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lootens, D.; Capel, F.; Durand, D.; Nicolai, T.; Boulenger, P.; Langendorff, V. (2003) Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. **Food Hydrocoll.** 17, 237–244. ([https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00056-5)).
- Lopes, T. J.; Soares, J. F.; Rodrigues, A. E.; Pessoa, F. L. P. (2024) Biodegradation behavior of polysaccharide-based biopolymers in soil: comparative analysis of alginate and pectin matrices. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 32, p. 1123–1137.

- Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, 15, 550.
- Lukas, B., Schmiderer, C., & Novak, J. (2015). Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. **Phytochemistry Reviews**, 14, 1–33. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-014-9362-0>
- Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F. DOS; Matsuoka, K.; Bezerra, J. L. (2001) Doenças causadas por Phytophthora no Brasil. Campinas: **Editora Rural**, 757p.
- Maciel, A.N. (2013) **Influência do Íon Ca²⁺ no desenvolvimento de micropartículas de alginato de sódio preparadas por gelatinização iônica**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade de Brasília.
- Maffei, M. (2010) Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany** 76:612-631.
- Majewska E, Kozłowska M, Gruczyńska-Sękowska E, Kowalska D, Tarnowska K. (2019) Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and Uses for Food Preservation – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. 69(4):327–341. doi:10.31883/pjfn/113152.
- Maran, J. P.; Sivakumar, V.; Thirugnanasambandham, K.; Sridhar, R. (2017) Extraction of pectin from *citrus* peel: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 169–180.
- Marchese, A. M. de; Filippone, M.P. Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 38, n. 1, p. 9–21, 2018.
- Marchese, A., et al. (2017). Antifungal and antibacterial activities of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, 43(6), 668–689.
- Marchese, A.; Arciola, C.R.; Coppo E.; Barbieri, R.; Barreca, D.; Cheaibi, S.; Sobarzo, E.; Nabavi, S.F.; S.M.; Daglia, M. (2018) The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: Mechanisms, synergies, and bio-inspired anti-infective materials. **Biofouling** 2018, 34, 630–656.
- Marrone, P. G. An effective biofungicide with novel mode of action. **Pesticide Outlook**, v. 13, p. 193–194. 2019.
- Mateos FV, Rickauer M, Esquerré-Tugayé M-T. (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulosebinding and lectin-like activities. **Mol Plant Microbe Interact**. 10(9):1045–1053. doi:10.1094/MPMI.1997.10.9.1045
- Máximo HJ, Dalio RJD, Rodrigues CM, Breton MC, Machado MA (2017). Reference genes for RT-qPCR analysis in *Citrus* and *Poncirus* infected by zoospores of *Phytophthora parasitica*. **Tropical Plant Pathology**. 42:76.
- Maximo, H.J., Dalio, R.J.D., Dias, R.O., Litholdo, C.G. JR, Felizatti, H.L., Machado, M.A. (2019) PpCRN7 and PpCRN20 of *Phytophthora parasitica* regulate plant cell death leading to enhancement of host susceptibility. **BMC Plant Biology**. 19(1):544. doi: 10.1186/s12870-019-2129-8.
- Medeiros, C. (2023) A revolução e o futuro da agricultura. **Total Agro: A Granja**, ed. 899, p. 28–29.
- Medina-Romero, Y.M., Hernandez-Hernandez, A.B., Rodriguez-Monroy, M.A. et al. Essential oils of *Bursera morelensis* and *Lippia graveolens* for the development of a new biopesticides in postharvest control. **Sci Rep** 11, 20135 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99773-0>
- Menge JA. (1993) Improved root rot control with mulches. *California Citrograph*. 79: 16-17.
- Meresa BK, Ayimut K-M, Weldemichael MY. et al. (2024) Carbohydrate elicitor-induced plant immunity: advances and prospects. **Heliyon**;10:e34871. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34871>
- Meyer, M. C.; Bueno A. F.; Mazaro, S. M.; Silva, J. C. Bioinsumos na cultura da soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-depublicacoes/publicacao/1143066/bioinsumos-na-culturada-soja>>. Acesso em: 1 nov. 2023.
- Min, B.; Park, S.; Choi, M. J. (2017) Development of essential oil-loaded pectin-based microcapsules by spray drying: physical properties and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 235, p. 303–311.
- Miziorko, H. M. (2011) Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis **Arch. Biochem. Biophys.**, 505 (2), pp. 131-143, 10.1016/j.abb.2010.09.028
- Morais, L. A. S., et al. (2012). Yield and chemical composition of oregano essential oil grown under Brazilian conditions. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 14, 464–469. <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/3XKYP5ZdQh6p3kh7mPLSQKp>
- Naqvi SAMH. (2000) Distribution of *Phytophthora* spp. And mating types pathogenic to *citrus* in Vidarbha and marathwada region of Maharashtra and Northeastern states of India. In: Singh S, Gosh SP, editors. Proceeding of the “Hi-Tech *Citrus* management- **Int. Symposium, citriculture**, Nagpur india”. ; p. 1073-80.
- Naqvi SAMH. (2002) Fungal diseases of *citrus*-Diagnosis and management. **Technical Bulletin 5, NRC for citrus** Nagpur, India; p. 61.
- Nazzaro, F. et al. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Molecules**. <https://doi.org/10.3390/molecules18017534>

- Nazzaro, F.; Orlando, P.; Fratianni, F.; Coppola, R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182–186.
- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, 101(1), 372–378.
- Nostro, A.; Papalia, T. (2012) Antimicrobial activity of carvacrol: Current progress and future prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**. 7, 28–35.
- O’connell, R. J.; Panstruga, R. (2006) Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. **New Phytologist**, 171, 4, 699-718.
- Oakenfull, D.; Scott, A. (1984) Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. *J. Food Sci.* 49, 1093–1098. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb10401.x>)
- Olawuyi, I.F.; Kim, S.R.; Hahn, D.; Lee, W.Y. (2020) Influences of combined enzyme-ultrasonic extraction on the physicochemical characteristics and properties of okra polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 100, 105396 (<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105396>).
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, O., Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, 24(7), 685-693.
- Oliveira, HBM; Selis, NN; Sampaio, BA, Júnior, MNS; Carvalho, SP; Almeida JB et al. (2021) Citral modulates virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**. 11:16482 doi: 10.1038/s41598-021-95971-y
- OuYang, Q., Tao, N. & Jing, G. (2016). Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of *citrus* green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC Genomics**, 17, 599.
- Park, C.K.; Li, H.Y.; Yeon, K.Y.; Jung, S.J.; Choi, S.Y.; Lee, S.J.; Lee, S.; Park, K.; Kim, J.S.; OH, S.B. (2006) Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. **Journal of Dental Research** 85, 900–904.
- Pedroso, D. D. L., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., Favaro-trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spraychilling. **International Dairy Journal**, 26(2), 127–132.
- Pei Y, Ji P, Miao J, Gu X, Wang H, Zhao Y, Song W, Guo Z, Zhou H, Shen D, Liu J, Si J, Yan J, Ren Y, Bao Y, Yin Z, Dou D. (2024) A receptor kinase senses sterol by coupling with elicitors in auxotrophic *Phytophthora*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2024 Nov 5;121(45):e2408186121. doi: 10.1073/pnas.2408186121. Epub 2024 Oct 30. PMID: 39475635; PMCID: PMC11551405.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T. & Salzberg, S. L. (2015). (**StringTie / quantificação** — referenciado no método).
- Pinto D.A. Mantovani E.C. Melo E. de C. Sedyama, G.C. Vieira, G. H. S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus* DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.1, p.54-61,2014.
- Pinto, E. et al. (2006) Antifungal activity of oregano essential oil. **Journal of Medical Microbiology**, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46655-0>
- Pontes-Quero GM, Esteban-Rubio S, Cano JP, Aguilar MR, Vázquez-Lasa B. (2021) Oregano Essential Oil Micro-and Nanoencapsulation With Bioactive Properties for Biotechnological Biomedical Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** .9 .703684 doi:10.3389/fbioe.2021.703684.
- Pontes-Quero, G. M.; Benítez, A.; Herrera-Barrios, A.; López-Bravo, J.; Fernández-González, A.; Cuevas, J.; González-Melendi, P.; Serrano-Morilla, M.; González-García, M. P.; Pereira, E.; Del Pozo, J. C. (2021) **Nanotechnology and encapsulation technologies in agriculture**. *Agronomy*, v. 11, n. 5, p. 1–27.
- Rastogi, R.; Sultyana, Y.; Aqil, M.; Ali, A.; Kumar, S.; Chuttani, K.; Mishra, A. K. (2007) Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics** 334, 71-77.
- Raut, J.S., & Karuppaiyl, S.M. (2014). Uma revisão do estado atual das propriedades medicinais dos óleos essenciais. **Industrial Crops and Products**, 62, 250–264.
- Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., Gigante, M. L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, 1 66, 424–431.
- Rincón, E.; Espinosa, E.; Baeza, J.; Carrasco, C.; Rodríguez, A. (2020) Orange peel waste valorization for the production of bioactive compounds: pectin extraction and characterization. **Waste Management**, v. 102, p. 505–513.
- Rodrigues, M.L. Archer, M. Martel, P. Miranda, S. Thomaz, M. Enguita, F.J. Baptista, R.P. et al. (2006) Crystal structures of the free and sterol-bound forms of β -cinnamomin **Biochim. Biophys. Acta**, 1764 (1), pp. 110-121, 10.1016/j.bbapap.2005.09.008
- Saritha, M.; Tollamadugu, N. V. K. V. P. The status of research and application of biofertilizers and biopesticides: Global scenario. In: Recent developments in applied microbiology and biochemistry. **Elsevier**, 2019. p. 196–207.

- Schaller, H. (2003) The role of sterols in plant growth and development **Prog. Lipid Res.**, 42 (3), pp. 163-175, 10.1016/S0163-7827(02)00047-4
- Schmittthener, A. F.; Bhat, R.G. (1994) Useful methods for studying *Phytophthora* in the laboratory. **OARDC Special Circular 143**. Ohio State University, Department of Plant Pathology, Wooster. 10p.
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). Gelatine handbook: theory and industrial practice. **John Wiley & Sons**.
- Secchi, E. Munarin, F. Alaimo, M. D. Bosisio, S. Buzzaccaro, S. Ciccarella, G. Vergaro, V. Petri, P. & Piazza R. (2014) External and Internal Gelation of pectin solutions: microscopic dynamics versus macroscopic rheology. **J. Phy.: Condens. Matter** 26 46106 (doi.10.1088/0953-8984/26/46/46410).
- Séjalon-Delmas N, Mateos FV, Bottin A, Rickauer M, Dargent R, Esquerré-Tugayé M. (1997) Purification, elicitor activity, and cell wall localization of a glycoprotein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a fungal pathogen of tobacco. **Phytopathology**. 87(9):899–909. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.9.899
- Sharma, B.; Naresh, L.; Dhuldhoya, N.; Merchant, S.; Merchant, U. (2006) An overview on pectins. **Times Food Process. J.** 23, 44–51.
- Simpson, B. K.; Aryee, A. N.; Toldrá, F. (2019) (Ed.). Byproducts from agriculture and fisheries: Adding value for food, feed, pharma, and fuels. **John Wiley & Sons Ltd.**, p. 479–500. Abbey, L. et al. Biopesticides and biofertilizers: Types, production, benefits, and utilization.
- Singh, G. et al. (2010) Antifungal activity of lemongrass oil. **Industrial Crops and Products**, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.10.012>
- Siroli, L.; Braschi, G.; de Jong, A.; Kok, J.; Patrignani, F.; Lanciotti, R. (2018) Transcriptomic approach and membrane fatty acid analysis to study the response mechanisms of *Escherichia coli* to thyme essential oil, carvacrol, 2-(E)-hexanal and citral exposure. **Journal of Applied Microbiology**. 125, 1308–1320.
- Soković, M., et al. (2008). Antifungal activity of essential oils and their components against the fungi isolated from deteriorated maize. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 23(1), 435–439.
- Song, W.; Yin, Z.; LU, X.; Shen, D.; Dou, D. (2023) Plant secondary metabolite citral interferes with *Phytophthora capsici* virulence by manipulating the expression of effector genes. **Molecular Plant Pathology** 24(8):932-946. doi: 10.1111/mpp.13340.
- Souza, S., Gomes, A. M., Pintado, M. H., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., Duarte, A. C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Freitas, A. C. (2015). Characterization of freezing effect upon stability of probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioprocess Processing**, 93, 90–97.
- Sriamornsak, P. Thirawong, N. Puttipipatkachorn, S. (2004) Morphology and Buoyancy of Oil-entrapped Calcium Pectinate Gel Beads. **The AAPS Journal** 2004; 6 (3) Article 24. (https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2751249/pdf/12248_2008_Article_6365.pdf)
- Sun, X., Cameron, R. G., and Bai, J. (2019). Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix. **Food Hydrocolloids**. 92, 69–73. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.006
- Thines, M., Mishra, B. & Ploch, S. (2023) Multigene analyses with a broad sampling in *Phytophthora* and related genera provide evidence for the monophyly of downy mildews. **Mycol Progress** 22, 82. <https://doi.org/10.1007/s11557-023-01932-2>
- Tordai H, Bányai L, Patthy L. (1999) The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. **FEBS Lett.** 461(1–2):63–67. doi:10.1016/S0014-5793(99)01416-7
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristiani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 49(6):2474-8 <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478>.
- Tyagi, A.; Malik, A. (2011) Antimicrobial potential of lemongrass oil. **Journal of Applied Microbiology**, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04845.x>
- Tyler, B. M. (2002) Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 137-167.
- Tzortzakakis, N.G. (2007). Manutenção da qualidade pós-colheita de produtos frescos com óleos essenciais: uma revisão. **Trends in Food Science & Technology**, 18(10), 538–548.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., & Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(10), 4606–4610.
- Valenga, F. (2007). **Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cakir, C., Schornack, S., Sklenar, J., Jones, A. M.; Kamoun, S. (2012) The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells. **PLoS Pathogens** 8, 8, e1002875.
- Van Den Berg, N. et al. (2021) Advances in Understanding Defense Mechanisms in *Persea americana* Against *Phytophthora cinnamomi*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 123.
- Van Jaarsveld E. (2001) **Phytophthora nicotianae on tobacco and its control in South Africa** [dissertation]. Pretoria: University of Pretoria.

- Van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 44:135-62. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- Vasconcelos, Y. Options on the table. **Revista Pesquisa FAPESP**, edição 271, set. 2018. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/en/options-on-the-table/>>. Acesso em: 28 out. 2024.
- Venturi V, Keel C. (2016) Signaling in the rhizosphere. **Trends Plant Sci** ;21:187–98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Vernière, C. et al. (2004) Variability in Pathogenicity among *Phytophthora* spp. Isolated from *Citrus* in Corsica. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 8-9, p. 476–483, 1 set.
- Vinci, G. Xia X. Vietia, R.A. (2008) Preservation of genes involved in sterol metabolism in cholesterol auxotrophs: facts and hypotheses. **PLoS One**, 3 (8) Article e2883
- Vriesmann, L.C.; de Oliveira Petkowicz, C.L. (2017) Cacao pod husks as a source of low-methoxyl, highly acetylated pectins able to gel in acidic media. **Int. J. Biol. Macromol.** 101, 146–152.
- Wang W, Xue Z, Xie L, Zhou X, Zhang F, Zhang S, Govers F, Liu X. (2023) Sterol-Sensing Domain (SSD)-Containing Proteins in Sterol Auxotrophic *Phytophthora capsici* Mediate Sterol Signaling and Play a Role in Asexual Reproduction and Pathogenicity. **Microbiol Spectr.** Feb 14;11(1):e0379722. doi: 10.1128/spectrum.03797-22. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36629430; PMCID: PMC9927452.
- Wang, W. Liu, X. Govers, F. (2021) The mysterious route of sterols in oomycetes **PLoS Pathog.**, 17 (6), Article e1009591, 10.1371/journal.ppat.1009591
- Wang, W., Yang, J., Zhang, J., Liu, Y.-X., Tian, C., Qu, B. et al. (2020). An Arabidopsis secondary metabolite directly targets expression of the bacterial type III secretion system to inhibit bacterial virulence. **Cell Host & Microbe**, 27, 601–611 e607.
- Wei D., Wang L., Liu C., Wang B. β -Sitosterol Solubility in Selected Organic Solvents. **Journal of Chemical & Engineering Data** 2010 55 (8), 2917-2919 . DOI: 10.1021/je9009909
- Weizhen W., Tongshan C., Fan Z., Zhaolin X., Borui Z. and Xili L. (2022) Functional Analysis of the C-5 Sterol Desaturase PcErg3 in the Sterol Auxotrophic Oomycete Pathogen *Phytophthora capsici*. **Front. Microbiol.,Sec. Microbe and Virus Interactions with Plants** -Volume 13 - | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.811132>
- Whisson, S. C. et al. (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. **Nature**, 450, 7166, 115-118.
- Willats, W.G.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, J.P. (2001) Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Mol. Biol.** 47, 9–27.
- Wu CH, Yan HZ, Liu LF, Liou RF. (2008) Functional characterization of a gene family encoding polygalacturonases in *Phytophthora parasitica*. **Mol Plant Microbe Interact.** 21 (4):480–489. doi:10.1094/MPMI-21-4-0480
- Xie, Y., Ding, Y., Shao, X., Yao, C., Li, J., Liu, J. et al. (2021). *Pseudomonas syringae* senses polyphenols via phosphorelay crosstalk to inhibit virulence. **EMBO Reports**, 22, e52805. (exemplo de PSMs afetando reguladores de virulência).
- Xue, Z. Wang, W. Shen, J. Zhang, J. Zhang, X. Liu, X. (2021) A Patched-Like protein PsPTL is not essential for the growth and response to various stresses in *Phytophthora sojae* **Front. Microbiol.**, 12 (2021), Article 673784
- Yamasaki Y, Kunoh H, Yamamoto H, Akimitsu K. (2007) Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in *citrus* defense. **Journal of General Plant Pathology** 73:168-79; <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-0070013-0>.
- Yan HZ, Liou RF. (2005) Cloning and analysis of pppg1, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. **Fungal Genet. Biol.** 42(4):339–350. doi:10.1016/j.fgb.2005.01.003
- Yang, X. Jiang, X. Yan, W. Huang, Q. Sun, H. Zhang, X. Zhang, Z. Ye, W. Wu, Y. Govers, F. Liang, Y. (2021) The mevalonate pathway is important for growth, spore production, and the virulence of *Phytophthora sojae* **Front. Microbiol.**, 12, Article 772994, 10.3389/fmicb.2021.772994
- Yousef, L.F. Yousef, A.F. Mymryk, J.S. Dick, W.A. Dick, R.P. (2009) Stigmasterol and cholesterol regulate the expression of elicitor genes in *Phytophthora sojae* **J. Chem. Ecol.**, 35 (2009), pp. 824-832, 10.1007/s10886-009-9653-1
- Yu, L., Fan, J. Zhou, C. Xu, C. (2021) Sterols are required for the coordinated assembly of lipid droplets in developing seeds **Nat. Commun.**, 12 (1), p. 5598, 10.1038/s41467-021-25908-6
- Zhang L, Van Kan J.A.L. (2013) Pectin as a barrier and nutrient source for fungal plant pathogens. In: Kempken, F. (eds). *Agricultural Applications. The Mycota*. Berlin, Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 2013, 361–75, DOI: 10.1007/978-3-642-36821-9_14
- Zheng, S., Jing, G., Wang, X., Ouyang, Q., Jia, L. & Tao, N. (2015). Citral exerts its antifungal activity against *Penicillium digitatum* by affecting the mitochondrial morphology and function. **Food Chemistry**, 178, 76–81.
- Zitko SE, Timmer LW. (1994) competitive parasitic activities of *Phytophthora parasitica* and *P. palmivora* on fibrous roots of *citrus*. **Phytopathology**. 84: 1000-4.
- Gamir, J. Darwiche, R. Van't Hof, P. Vineet, C. et al. (2016) The sterol-binding activity of pathogenesis-related protein 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. **The plant Journal**. Volume 89, Issue 3 pages 502-509. <https://doi.org/10.1111/tj.13398>