

**INSTITUTO AGRONÔMICO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL**

**CONTROLE DA FERRUGEM E DA MANCHA-
AUREOLADA DO CAFEEIRO ATRAVÉS DO USO DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA ALBA***

TAILA GOMES BOTELHO

Orientador: Jorge Mauricio Costa Mondego

Campinas, SP

2026

**INSTITUTO AGRONÔMICO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL**

**CONTROLE DA FERRUGEM E DA MANCHA-
AUREOLADA DO CAFEIEIRO ATRAVÉS DO USO DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA ALBA***

TAILA GOMES BOTELHO

Orientador: Jorge Mauricio Costa Mondego

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical do Instituto Agronômico de Campinas como requisito para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical Área de concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Campinas, SP

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha elaborada pela bibliotecária do Seção de Documentação Científica do Instituto Agrônômico

B748c Botelho, Taila Gomes
Controle da ferrugem e da mancha-aureolada do cafeeiro através do uso de óleos essenciais de *Lippia alba* / Taila Gomes Botelho.
Campinas, 2026. 52 fls.

Orientador: Jorge Mauricio Costa Mondego
Dissertação (Mestrado) Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto Agrônômico

1. *Coffea arabica*, 2. Erva Cidreira. 3. *Hemileia vastatrix*;
4. *Pseudomonas coronafaciens* pv *garcae*. 5. Quimiotipo.
I. Mondego, Jorge Mauricio Costa. II. Título

CDD 633.73



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



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 20 de março de 2026, às 09h00, 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 Taila Gomes Botelho, para obtenção do título de **"MESTRE"**, conforme Processo SAA nº PRT6927/2024-41. A sessão presidida pelo Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego, orientador da aluna, foi realizada em sessão pública aberta. Iniciados os trabalhos, a candidata submeteu-se ao exame de sua dissertação, intitulada "CONTROLE DA FERRUGEM E DA MANCHA-AUREOLADA DO CAFEEIRO ATRAVÉS DO USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LIPPIA ALBA". Terminado o exame, procedeu-se ao julgamento, cujo resultado foi o seguinte:

Prof. Dr. Jorge Maurício Costa Mondego - IAC

APROVADA (X) REPROVADA ()

Profª. Drª. Marcia Ortiz Mayo Marques - IAC

APROVADA (X) REPROVADA ()

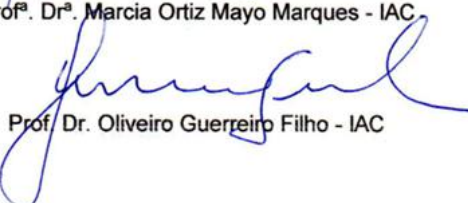
Prof. Dr. Oliveiro Guerreiro Filho - IAC

APROVADA (X) REPROVADA ()

Apurados os resultados, constatou-se que a candidata foi habilitada, 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. Marcia Ortiz Mayo Marques - IAC


Prof. Dr. Oliveiro Guerreiro Filho - IAC

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, Jorge Mondego, pela oportunidade de ingressar no programa, pela confiança depositada em mim e pelo acompanhamento ao longo de todo o mestrado. Sou grata pelo apoio constante, pela paciência, empatia e compreensão diante dos desafios do percurso, bem como pela orientação segura e humana, que contribuíram de forma decisiva para a realização deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e pessoal. À Marina Erê, agradeço imensamente pelo apoio contínuo durante a execução dos experimentos e ao longo de toda a trajetória do mestrado. Sua disponibilidade, atenção e colaboração foram fundamentais, assim como o incentivo e as trocas que ampliaram minha forma de enxergar o processo de pesquisa. Ao Marcus Prior, agradeço pela parceria construída ao longo do mestrado, pelo apoio nos momentos necessários e pela convivência acadêmica, que tornaram essa caminhada mais colaborativa. À Natalia e ao Cesar, agradeço pelo apoio, paciência e disposição em compartilhar conhecimentos e experiências, contribuindo para a superação dos desafios inerentes à pós-graduação. À Jordana, agradeço pela ajuda na escrita e revisão deste trabalho, bem como pela amizade e parceria ao longo dessa jornada. A toda a equipe do LABIPLAM, agradeço pela colaboração direta ou indireta, pelo apoio nos estudos e experimentos e pela convivência diária. Ao grupo da Fitoquímica, agradeço pela disponibilidade, pelo apoio técnico e pelo compartilhamento de conhecimentos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Ao grupo do café, agradeço pelo suporte ao longo dos experimentos e pela colaboração nas diferentes etapas do trabalho. À Mako, ao Lucas e à Flávia, bem como às suas respectivas equipes, agradeço pelo apoio, pelas orientações e pela disponibilidade ao longo do mestrado. Agradeço a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, assim como às equipes da pós-graduação, do IAC, da APTA e do IB, pelo suporte institucional ao longo dessa trajetória. Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal durante o mestrado.

Declaração de uso de Inteligência Artificial

Ferramentas de inteligência artificial generativa (ChatGPT, OpenAI) foram utilizadas como apoio na revisão textual e elaboração de figuras e gráficos, sendo o conteúdo científico de responsabilidade exclusiva da autora.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Óleos essenciais	2
2.2 <i>Lippia alba</i>	5
2.3 Cafeeiro.....	7
2.4 Ferrugem do cafeeiro causada por <i>Hemileia vastatrix</i>	11
2.5 Mancha aureolada causada por <i>Pseudomonas coronafaciens pv. garcae</i>	13
2.6 Bioinsumos	15
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	17
4.1.1 Critério de seleção dos acessos de <i>Lippia alba</i>	17
4.1.2 Coleta dos acessos de <i>Lippia alba</i>	18
4.1.3 Extração do óleo essencial.....	19
4.1.4 Perfil Químico de Óleos Essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	20
4.2 Ensaio com <i>Hemileia vastatrix</i>	21
4.2.1 <i>In vitro</i>	21
4.2.1.1 Delineamento experimental	21
4.2.1.2 Obtenção do inóculo, preparo e viabilidade.....	21
4.2.1.3 Avaliação da atividade antifúngica sobre os esporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	23
4.2.2 <i>In planta</i>	24
4.2.2.1 Obtenção das mudas de <i>Coffea arabica</i> para ensaios <i>in planta</i>	24
4.2.2.2 Delineamento experimental	25
4.2.2.3 Preparo dos óleos essenciais de <i>Lippia alba</i> para aplicação.....	26
4.2.2.4 Aplicação dos óleos essenciais nas folhas de Bourbon Amarelo	28
4.2.2.5 Inoculação de <i>Hemileia vastatrix</i> nas folhas de Bourbon Amarelo	29
4.2.2.6 Avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre a ferrugem.....	30
4.2.2.7 Análise de dados.....	30
4.3 Ensaio com <i>Pseudomonas coronafaciens pv garcae</i>	31

4.3.1 <i>In vitro</i>	31
4.3.1.1 Delineamento experimental	31
4.3.1.2 Preparo da placa de Microdiluição em caldo	32
4.3.1.3 Avaliação da atividade antibacteriana no ensaio de Microdiluição em caldo	32
4.3.1.4 Interpretação dos resultados	33
4.3.2 <i>In planta</i>	34
4.3.2.1 Obtenção das mudas de <i>Coffea arabica</i> para ensaios in planta	34
4.3.2.2 Delineamento experimental	34
4.3.2.3 Inoculação de <i>Pseudomonas coronafaciens pv garcae</i> nas folhas de Catuaí Amarelo	
35	
4.3.2.4 Preparo dos óleos essenciais para aplicação	35
4.3.2.5 Avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre a mancha aureolada	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Rendimento e Caracterização química dos óleos essenciais	37
5.2 Ensaio com <i>Hemileia vastatrix</i>	37
5.2.1 <i>In vitro</i>	37
5.2.2 <i>In planta</i>	38
5.3 Ensaio com <i>Pseudomonas coronafaciens pv. garcae</i>	40
5.3.1 <i>In vitro</i>	40
5.3.2 <i>In planta</i>	40
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

Controle da ferrugem e da mancha-aureolada do cafeeiro por meio do uso de óleos essenciais de *Lippia alba*

RESUMO

Os óleos essenciais de origem vegetal, apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica despertando interesse como potenciais alternativas para o manejo sustentável de doenças na agricultura. Este estudo avaliou a eficácia de óleos essenciais extraídos de *Lippia alba* sobre dois patógenos do cafeeiro (*Coffea arabica*), *Hemileia vastatrix* (ferrugem) e *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* (mancha-aureolada). Utilizando ensaios *in vitro* e *in planta*, considerando diferentes concentrações e momentos de aplicação (preventivo e curativo). Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e caracterizados por cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massas (GC-MS). A caracterização química dos óleos essenciais por GC-MS identificaram quimiotipos ricos em linalol (LA-42), citral (LA-108), mirceno (LA-129) e combinação citral-mirceno (LA-132). Os experimentos foram conduzidos separadamente para cada patógeno. Os ensaios *in vitro* foram conduzidos com o objetivo de selecionar os óleos essenciais a serem avaliados *in planta*, utilizando métodos de microdiluição em caldo. Os ensaios *in planta* foram conduzidos com o objetivo de tratar folhas infectadas de mudas de café com emulsões óleo-água dos óleos essenciais. Preparadas com tween 80 nas concentrações de 0,0125% a 0,2%. Estas, foram aplicadas de forma preventiva e curativa (24 horas antes e depois da inoculação do patógeno). Os sintomas foram avaliados por escala de notas de 0 a 5, sendo a última a maior severidade. As estatísticas realizadas foram a análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os resultados obtidos *in vitro* não se reproduziram *in planta* para os dois patógenos avaliados. Para *Hemileia vastatrix* *in vitro* os quimiotipos citral (LA-108), mirceno (LA-129) e citral/mirceno (LA-132) demonstraram atividade fungicida nas concentrações de 0,0125%, 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,2%. Já *in planta*, os mesmos quimiotipos apresentaram atividade fungistática, sendo o quimiotipo mirceno (LA-129) na concentração de 0,05% o único a ter melhor atividade. Por outro lado, as concentrações de 0,0125% resultaram em aumento da severidade, possivelmente associado à modulação da microbiota da fitosfera. Para *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* *in vitro*, os quimiotipos linalol (LA-42) e citral/mirceno (LA-132) tiveram atividade bactericida nas concentrações de 0,25 e 0,50%. Já *in planta* os mesmos quimiotipos tiveram atividade bacteriostática, sendo o citral/mirceno (LA-132) na concentração de 0,025% com melhor redução da doença. Através destes resultados foi possível observar que óleos essenciais com a presença do quimiotipo mirceno, apresentam potencial significativo no controle de patógenos de ciclos de vida completamente diferentes entre si. E que quimiotipos ricos em linalol e citral isoladamente não apresentaram potencial significativo nas concentrações avaliadas. Deste modo, pode-se concluir que os óleos essenciais de *Lippia alba* possuem potencial como bioinsumos. No entanto, fatores como o quimiotipo, concentração e sincronização da aplicação com as etapas mais vulneráveis do ciclo do patógeno devem ser estudados para validar o uso como potenciais bioinsumos.

Palavras-chave: *Coffea arabica*; Erva Cidreira; *Hemileia vastatrix*; *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*; Quimiotipo.

Control of Coffee Leaf Rust and Bacterial Halo Blight Using Essential Oils from *Lippia alba*

ABSTRACT

Essential oils of plant origin exhibit antimicrobial and antifungal activity, attracting interest as potential alternatives for the sustainable management of diseases in agriculture. This study evaluated the efficacy of essential oils extracted from *Lippia alba* against two coffee pathogens (*Coffea arabica*), *Hemileia vastatrix* (coffee leaf rust) and *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* (bacterial halo blight), using in vitro and in planta assays and considering different concentrations and application timings (preventive and curative). The essential oils were extracted by hydrodistillation and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The chemical characterization of the essential oils by GC-MS identified chemotypes rich in linalool (LA-42), citral (LA-108), myrcene (LA-129), and a citral–myrcene combination (LA-132). The experiments were conducted separately for each pathogen. The in vitro assays were carried out with the objective of selecting the essential oils to be evaluated in planta, using broth microdilution methods. The in planta assays were conducted with the objective of treating infected leaves of coffee seedlings with oil–water emulsions of the essential oils prepared with Tween 80, at concentrations ranging from 0.0125% to 0.2%, applied preventively (24 hours before inoculation) or curatively (24 hours after inoculation). Symptoms were evaluated using a severity scale ranging from 0 to 5, with the latter corresponding to the highest severity level. Statistical analyses included analysis of variance, mean comparison by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$), and the area under the disease progress curve (AUDPC). The in vitro results were not reproduced in planta for either of the evaluated pathogens. For *Hemileia vastatrix*, the citral (LA-108), myrcene (LA-129), and citral/myrcene (LA-132) chemotypes demonstrated fungicidal activity in vitro at concentrations of 0.0125%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, and 0.2%. In planta, however, the same chemotypes exhibited fungistatic activity, with the myrcene chemotype (LA-129) at 0.05% being the only treatment to show superior activity. In contrast, applications at 0.0125% resulted in increased disease severity, possibly associated with modulation of the phyllosphere microbiota. For *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, the linalool (LA-42) and citral/myrcene (LA-132) chemotypes exhibited bactericidal activity in vitro at concentrations of 0.25% and 0.50%. In planta, however, the same chemotypes showed bacteriostatic activity, with citral/myrcene (LA-132) at 0.025% providing the greatest disease reduction. Through these results, it was possible to observe that essential oils containing the myrcene chemotype have significant potential for controlling pathogens with completely different life cycles. In contrast, chemotypes rich in linalool and citral, when evaluated individually, did not show significant potential at the tested concentrations. Thus, it can be concluded that essential oils from *Lippia alba* have potential as bioinputs. However, factors such as chemotype, concentration, and synchronization of application with the most vulnerable stages of the pathogen life cycle should be further investigated to validate their use as potential bioinputs.

Keywords: *Coffea arabica*; Lemon balm; *Hemileia vastatrix*; *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*; Chemotype

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais extraídos principalmente de plantas aromáticas possuem atividade antimicrobiana já conhecida tanto na medicina popular quanto na indústria química, farmacêutica e cosmética. Nos últimos anos, esses compostos passaram a receber maior atenção na agricultura devido às pressões relacionadas à sustentabilidade e à redução do uso de pesticidas sintéticos. Para aplicação agrícola, um óleo essencial com potencial fitossanitário deve apresentar características como estabilidade química, atividade antimicrobiana em baixas concentrações e ação sobre diferentes grupos de microrganismos. Nesse contexto, *Lippia alba* destaca-se como uma espécie promissora. Conhecida popularmente como erva-cidreira ou melissa, é uma planta nativa do Brasil, amplamente distribuída no país e tradicionalmente utilizada na medicina popular. O óleo essencial de *L. alba* apresenta atividade antimicrobiana contra diferentes tipos de microrganismos patogênicos, incluindo fungos e bactérias de interesse humano e agrícola. Além disso, sua atividade ocorre em baixas concentrações, indicando elevado potencial biológico. A espécie também apresenta alta variabilidade genética e química, formando diferentes quimiotipos associados à produção de compostos voláteis específicos, característica que pode influenciar diretamente sua atividade antimicrobiana. Considerando esse potencial, o uso de óleos essenciais de *L. alba* na agricultura pode representar uma alternativa sustentável para o manejo de doenças de culturas de importância econômica. Nesse contexto, o cafeeiro apresenta grande relevância. Além da importância econômica para o Brasil e do reconhecimento mundial da cultura, o café constitui um modelo interessante para estudos fitopatológicos devido à presença de diferentes patógenos de importância agrícola. Entre eles destaca-se *Hemileia vastatrix*, fungo biotrófico responsável pela ferrugem do cafeeiro e altamente específico ao hospedeiro, infectando exclusivamente espécies do gênero *Coffea*. Avaliar a ação dos óleos essenciais de *L. alba* sobre esse patógeno pode contribuir para compreender o potencial desses compostos no controle de doenças foliares do cafeeiro. Além disso, considerando que os óleos essenciais apresentam atividade sobre diferentes grupos microbianos, o presente estudo também incluiu *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, bactéria associada à mancha-aureolada do cafeeiro e que apresenta ciclo biológico distinto de *H. vastatrix*. Enquanto o fungo possui colonização lenta e altamente especializada, a bactéria apresenta rápido crescimento e elevada capacidade de disseminação, permitindo avaliar a resposta dos óleos essenciais em diferentes sistemas patogênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são misturas de compostos voláteis formadas por dezenas a centenas de constituintes químicos distintos. Sua composição varia conforme a espécie vegetal, sendo constituída predominantemente por terpenos e terpenoides, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos. Esses compostos são formados por estruturas com unidades básicas de carbono, especialmente unidades de isopreno (Mohammed et al., 2025; Rodrigues et al., 2025; Sousa et al., 2023). Entretanto, outros grupos químicos também podem estar presentes em diferentes proporções, incluindo compostos fenólicos, fenilpropanoides, aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres e hidrocarbonetos alifáticos. A abundância relativa dessas classes químicas é responsável pelas diferenças de aroma, propriedades biológicas e aplicações dos óleos essenciais (Dhifi et al., 2016; Mohammed et al., 2025; Sousa et al., 2023).

Em condições de estresse, plantas aromáticas ativam o metabolismo especializado, promovendo a síntese de terpenos, que são produzidos e acumulados em tecidos secretórios especializados (Dhifi et al., 2016). Nesses tecidos, como as folhas, a produção e o acúmulo de compostos voláteis ocorrem principalmente em estruturas como tricomas glandulares, sítios principais de produção e armazenamento desses compostos, localizados na superfície foliar, além de dutos e cavidades secretoras internas do parênquima (Borromeo et al., 2025; Gostin et al., 2024).

A biossíntese desses compostos está diretamente relacionada a duas vias metabólicas principais nas plantas: a via do mevalonato (MVA), localizada predominantemente no citosol e no retículo endoplasmático, e a via do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos plastídios. Ambas as vias são responsáveis pela produção dos precursores universais isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), que constituem as unidades básicas de cinco carbonos envolvidas na formação dos terpenos. A partir da condensação sucessiva dessas unidades, formam-se compostos intermediários de maior cadeia, como geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranilgeranil difosfato (GGPP), que atuam como precursores diretos das diferentes classes de terpenos. Esses intermediários são convertidos em monoterpenos,

sesquiterpenos e diterpenos por ação das enzimas terpeno sintases (TPS), responsáveis pela diversificação estrutural por meio de reações de ciclização e rearranjo molecular (Figura 1).

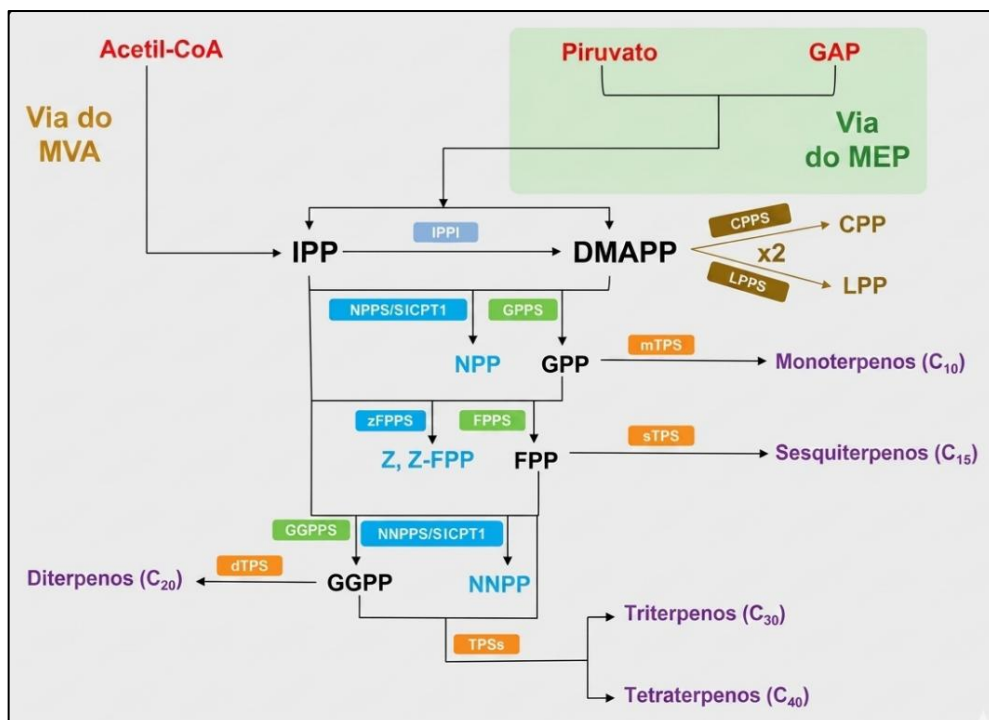


Figura 1. Biossíntese de terpenos. Fonte: Cheng et al. (2025).

Posteriormente, modificações catalisadas por enzimas como citocromos P450 promovem reações de oxidação e outras alterações estruturais, resultando na formação de terpenoides oxigenados e ampliando a diversidade química (Figura 2) observada nos óleos essenciais (Cheng et al., 2025).

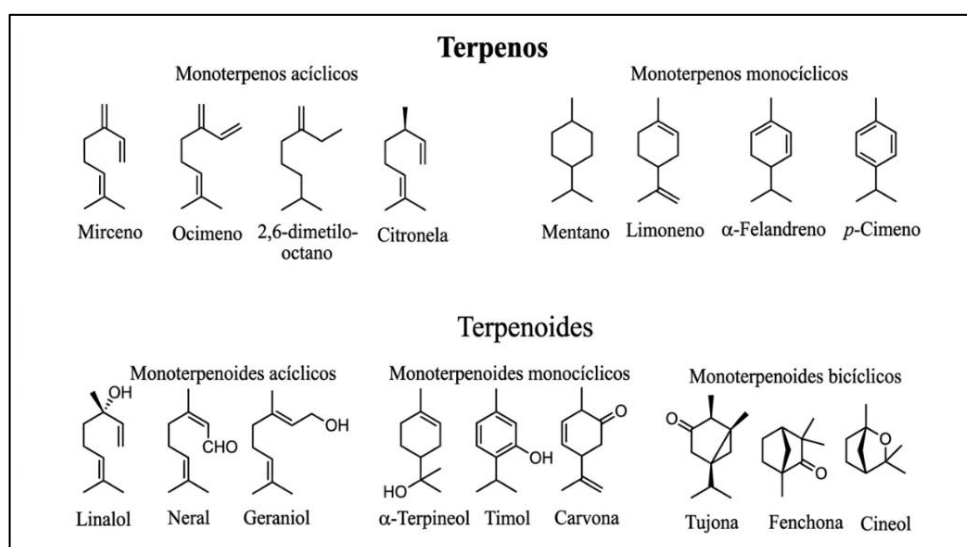


Figura 2. Estruturas químicas dos terpenos e terpenoides. Fonte: Ayu Masyita et al. (2022).

Além de sua complexidade estrutural, esses compostos desempenham funções ecológicas relevantes nas plantas, atuando principalmente como compostos voláteis de defesa e comunicação. Os Terpenoides podem exercer defesa direta contra herbívoros e patógenos, além de atuar na atração de polinizadores e na mediação de interações planta–inseto. Estes também participam da sinalização entre plantas, contribuindo para respostas defensivas coordenadas em nível comunitário (Blande 2021; Gershenzon, 2007).

As diferenças de perfis químicos dos OEs são de interesse industrial nas áreas de cosméticos, medicinal e, recentemente, na agricultura, como agentes antimicrobianos de origem vegetal, sendo impulsionadas pela crescente demanda por alternativas sustentáveis na agricultura (European Commission, 2020). Diversos estudos demonstram a capacidade dos OEs em inibir bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, reforçando seu potencial como bioinsumos (Allizond et al., 2023; Katirae et al., 2017; Porfírio et al., 2017). No entanto, a maior parte dessas evidências ainda se baseia em ensaios *in vitro*, nos quais a atividade antimicrobiana é avaliada apenas em condições de laboratório, sem considerar os processos fisiológicos da planta nem as interações que ocorrem nos tecidos vegetais. Embora esses estudos tenham identificado os óleos essenciais como fontes de compostos bioativos, a atividade observada desses metabólitos nem sempre se traduz em controle efetivo de patógenos quando os óleos são aplicados em plantas. Em condições reais, a eficácia pode variar, e patógenos podem tolerar ou se adaptar aos compostos voláteis, mesmo quando estes apresentam atividade comprovada em laboratório (Borges et al., 2018).

Além disso, a aplicação de óleos essenciais *in planta* ainda carece de uma base metodológica sólida. Faltam critérios padronizados sobre o estágio de desenvolvimento da planta em que será feita a aplicação, o local de aplicação (folhas, raízes etc.), bem como sobre doses e frequência de uso. Essa ausência de padronização, dificulta a comparação entre estudos e contribui para a variabilidade dos resultados observados em condições de *in planta*. Essas limitações revelam uma lacuna central: a falta de compreensão funcional da interação entre o óleo essencial, o patógeno e a planta hospedeira.

A planta exerce papel ativo nesse sistema, influenciando o desenvolvimento do patógeno. Peng et al. (2024) observaram que a estrutura da comunidade bacteriana da superfície foliar se altera durante o desenvolvimento da doença, indicando associação entre a dinâmica da microbiota e a progressão da infecção. Saleem et al. (2017) demonstraram que interações entre

microrganismos presentes na filosfera influenciam o desempenho das plantas sob estresse biótico, evidenciando o papel das comunidades microbianas associadas às folhas nas respostas do hospedeiro. Além disso, a planta também influencia a resposta aos compostos aplicados. A aplicação foliar de óleos essenciais promove aumento da atividade de enzimas associadas à defesa vegetal, indicando resposta fisiológica da planta aos compostos aplicados exogenamente (Stenger et al., 2021).

Ignorar esses componentes compromete a interpretação dos resultados e limita a aplicação agrônômica dos óleos essenciais. Assim, compreender como os óleos essenciais se comportam após a aplicação na planta e como diferentes métodos de uso influenciam a resposta do patógeno é essencial para transformar esse conhecimento em estratégias eficazes de controle (De Clerck et al., 2021; Dunan et al., 2023; Raveau et al., 2020).

2.2 *Lippia alba*

A espécie vegetal *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, conhecida popularmente como erva cidreira, pertence à família *Verbenaceae*. Esta é amplamente distribuída no Brasil, com registros de cerca de 15 gêneros e aproximadamente 290 espécies, ocorrendo principalmente nos domínios do Cerrado e da Mata Atlântica (Cardoso et al., 2021). Dentro dessa família, o gênero *Lippia* destaca-se pela diversidade de espécies e pela ampla distribuição no território brasileiro. Uma característica anatômica comum às espécies do gênero é a presença de tricomas glandulares nas folhas, estruturas responsáveis pela produção e pelo armazenamento dos óleos essenciais. A quantidade e o tipo desses tricomas podem variar entre espécies e entre diferentes genótipos, influenciando diretamente tanto o rendimento quanto a composição química dos óleos essenciais produzidos (De Clerck et al., 2021; Dunan et al., 2023; Oliveira et al., 2019; Rebouças; Ferreira, 2024).

No Brasil, *L. alba* apresenta ampla distribuição geográfica, com registros em todas as cinco grandes regiões do país. A espécie ocorre nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, abrangendo estados como Acre, Amazonas, Pará, Bahia, Pernambuco e Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. O que demonstra boa adaptação a diferentes condições ambientais (Cardoso, 2021; Cunha, 2017). No campo, é facilmente reconhecida por seu porte arbustivo, pela presença de flores visíveis durante o período de floração e pelo aroma forte e geralmente agradável (Figura 3).



Figura 3. Arbusto de *Lippia alba* (erva-cidreira).

Esse aroma está relacionado à produção de compostos voláteis no óleo essencial da espécie, conforme descrições botânicas recentes de sua morfologia e características aromáticas (World Flora Online, 2025). No Brasil, vem sendo amplamente estudada nas áreas farmacêutica e química, direcionada à caracterização de seus quimiotipos e à avaliação de propriedades farmacológicas, como atividades antimicrobiana, antioxidante e ansiolítica. Evidenciando o predomínio do enfoque medicinal (Camillo, 2017; Malik et al., 2021). Os estudos com enfoque agrícola concentram-se, em sua maioria, no manejo de doenças fúngicas avaliadas em condições controladas, priorizando parâmetros como a inibição do crescimento micelial ou a redução da severidade em plantas tratadas (Arvind Saroj et al., 2019). Portanto, embora o potencial antimicrobiano de *Lippia alba* seja amplamente reconhecido, sua aplicação *in planta* ainda não está consolidada.

O Instituto Agrônomo, em Campinas (IAC), mantém um banco de germoplasma de *Lippia alba* desenvolvido com o objetivo de reunir, conservar e explorar a diversidade genética e química da espécie para fins agrônômicos. Esse germoplasma, foi constituído a partir da coleta de acessos provenientes de diferentes regiões do Brasil, os quais foram multiplicados vegetativamente e caracterizados quanto à morfologia e à composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), conforme descrito por Ming et al. (2015).

A partir dessa caracterização, os acessos foram agrupados em diferentes quimiotipos, definidos pela predominância de compostos químicos majoritários no óleo essencial, como linalool, citral, mirceno e outros. Em *L. alba*, essa variabilidade química está associada à diversidade genética da espécie e constitui um critério fundamental para a seleção de materiais com potencial biológico diferenciado (Blank et al., 2019; Peixoto et al., 2017; Rebouças; Ferreira, 2024).

Esta diversidade quimiotípica de *L. alba* tem implicações diretas sobre a atividade biológica do óleo essencial, especialmente em relação à ação antimicrobiana. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa indicam que o seu óleo essencial apresenta amplo espectro antimicrobiano, com maior atividade frente a *Escherichia coli* (MIC < 0,25 mg/mL), em comparação a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (SANTOS, 2022). Diante desses resultados, surge a questão central deste trabalho: este potencial pode ser explorado no controle de fitopatógenos?

Dessa forma, o banco de germoplasma constitui um recurso estratégico para relacionar quimiotipos específicos a diferentes respostas antimicrobianas e para agregar valor agrônomo à espécie. Esse potencial está associado a características que favorecem sua aplicação prática no manejo agrícola, como a facilidade de cultivo, a adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e a atividade antimicrobiana de seu óleo essencial em baixas concentrações, fatores que contribuem para sua viabilidade econômica.

No entanto, sua consolidação como bioinsumo ainda é limitada pela falta de estudos *in planta*, especialmente sobre métodos de aplicação, comportamento do óleo essencial no ambiente foliar e interação com a planta hospedeira. Assim, embora *Lippia alba* apresente alto potencial como fonte de compostos antimicrobianos, ainda são necessários estudos integrados que avaliem seu uso *in planta* e em condições próximas às de cultivo. Considerando esse contexto, o presente trabalho utilizou acessos pertencentes a quimiotipos contrastantes, previamente caracterizados no banco de germoplasma do IAC, com o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano do seu óleo essencial no controle de patógenos do cafeeiro.

2.3 Cafeeiro

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, com aproximadamente dois bilhões de xícaras servidas diariamente, o que evidencia sua relevância econômica e social em

escala global, conforme destacado por Gosalvitr et al. (2023). O Brasil ocupa posição de destaque na cadeia cafeeira mundial, sendo o maior produtor e exportador de café, responsável por cerca de um terço da produção global em 2022, segundo dados da FAO (2023). Além disso, os grãos de café são cultivados principalmente em países tropicais, sendo o Brasil responsável por quase 50% da produção mundial (Ferreira et al., 2024). Em 2022, o Brasil exportou mais de 2,36 milhões de toneladas de grãos de café, tendo como principais destinos os Estados Unidos, a Alemanha, a Itália, a Bélgica e o Japão (Sera, 2025).

Devido à sua grande importância para a economia brasileira, a cafeicultura impacta a geração de renda, emprego e arrecadação de impostos. Estimativas indicam que o agronegócio do café gera aproximadamente R\$ 30,7 bilhões em renda e cerca de 695 mil empregos diretos e indiretos ao longo de sua cadeia produtiva. As exportações de café em grão contribuíram com cerca de R\$ 13,6 bilhões, além de significativa geração de renda e tributos, evidenciando o papel estratégico do setor para a economia nacional (Sesso et al., 2021). Portanto, é fundamental compreender as bases biológicas da cultura do cafeeiro, incluindo a origem e as características da espécie cultivada.

O cafeeiro pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*, que reúne cerca de 100 a 130 espécies descritas, distribuídas predominantemente em regiões tropicais da África, embora apenas algumas apresentem relevância econômica, destacando-se *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner e *Coffea liberica* Bull. ex Hiern, cujas sementes são utilizadas para a produção da bebida (Lashermes et al., 1999). Entre essas espécies, *Coffea arabica* (Figura 4) destaca-se por seu elevado valor comercial e pela alta qualidade sensorial da bebida produzida, sendo a espécie mais cultivada no Brasil e difundida nos sistemas de produção cafeeira.



Figura 4. Prancha botânica ilustrativa de *canephora*. Fonte: Wikipedia (2025).

A espécie *C. arabica* teve origem a partir de um cruzamento natural entre *C. canephora* e *C. eugenoides* e foi introduzida no Brasil no século XVIII, a partir de um número reduzido de plantas. Essa introdução limitada, contribuiu para a formação de lavouras geneticamente uniformes, condição que está associada à maior suscetibilidade da cultura a doenças foliares. No território nacional, as principais variedades de *C. arabica* cultivadas incluem Typica, Bourbon, Mundo Novo, Catuaí e Acaiá, das quais derivaram diversas seleções, subvariedades e híbridos amplamente utilizados na cafeicultura. Entre essas variedades, o Bourbon destaca-se por sua elevada suscetibilidade à ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, o que justifica sua utilização no presente estudo como material vegetal naturalmente sensível ao patógeno, permitindo uma avaliação rigorosa da eficiência dos óleos essenciais.

A produção de café demanda investimentos contínuos em implantação da lavoura, nutrição, colheita e manejo fitossanitário. Entre os fatores que impactam os custos de produção, destacam-se as doenças do cafeeiro, que podem reduzir a produtividade e exigir aplicações frequentes de produtos fitossanitários. Nesse contexto, a busca por alternativas que complementem as estratégias convencionais de manejo tem ganhado destaque, especialmente diante da crescente demanda por sistemas agrícolas sustentáveis. Os bioinsumos de origem vegetal, como os óleos essenciais, representam uma alternativa promissora por apresentarem atividade antimicrobiana e potencial aplicação no manejo integrado de doenças, podendo contribuir para a diversificação das ferramentas disponíveis ao produtor e para a redução da dependência exclusiva de insumos sintéticos (De Clerck et al., 2021; Dunan et al., 2023; Raveau et al., 2020).

Como toda cultura agrícola, o cafeeiro é afetado por diversas doenças que comprometem a produtividade e a qualidade dos grãos. Entre as mais relevantes destacam-se a ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, e a mancha-aureolada, causada pela bactéria *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*. Essas doenças provocam perdas significativas e envolvem patógenos com elevado potencial de adaptação e resistência (Oliveira et al., 2024; Toniutti et al., 2017).

Historicamente, o controle dessas doenças baseia-se principalmente no uso de produtos químicos, que apresentam alta eficiência e são utilizados há décadas. No entanto, as crescentes exigências ambientais, regulatórias e de mercado têm pressionado os sistemas produtivos a adotarem estratégias mais sustentáveis (Chauhan et al., 2026). Nesse contexto, o cafeeiro surge como um modelo adequado para a avaliação de produtos naturais, incluindo óleos essenciais, no manejo de doenças. É uma cultura bem estabelecida, com sistemas produtivos organizados, fácil condução experimental e ampla aceitação de tecnologias voltadas à sustentabilidade (Sai et al., 2025). Além disso, a aplicação de insumos naturais pode agregar valor ao produto, incentivar a sustentabilidade e fortalecer a competitividade do café brasileiro.

O cafeeiro também apresenta sistemas-modelo fitopatológicos relevantes para estudos de interação planta–patógeno. O *Hemileia vastatrix*, é um exemplo interessante, pois se trata de um fungo altamente especializado, capaz de infectar exclusivamente o cafeeiro. Tal especificidade é uma característica interessante para a investigação de estratégias alternativas de manejo e para o entendimento de como essas novas abordagens podem interferir na dinâmica da infecção (Talhinhas et al., 2017). Dessa forma, a escolha do cafeeiro como modelo neste

estudo justifica-se tanto por sua importância econômica e social quanto por sua relevância científica.

2.4 Ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix*

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Hemileia vastatrix*, é a principal doença foliar do *Coffea arabica*. Os sintomas incluem o aparecimento de manchas cloróticas (Figura 5a) na face adaxial das folhas, associadas à formação de pústulas alaranjadas na face abaxial (Figura 5b), culminando em desfolha precoce e redução do vigor das plantas.

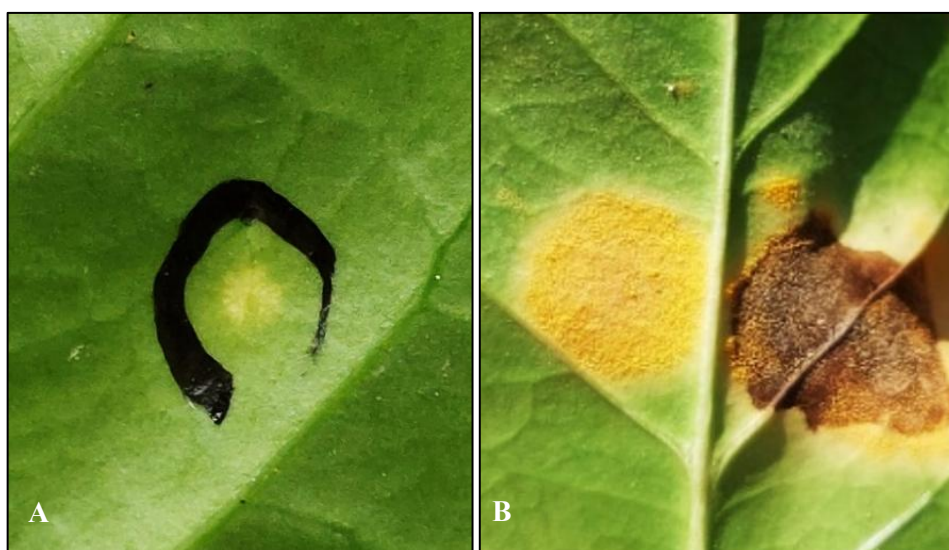


Figura 5. Lesões típicas de ferrugem em folha de *Coffea arabica*. **a.** macha clorótica; **b.** pústulas alaranjadas.

Isso provoca grandes perdas de produtividade, especialmente em regiões com alta umidade e temperaturas amenas, condições que favorecem a infecção e dificultam o manejo (Talhinhas et al., 2017).

O ciclo da ferrugem do cafeeiro inicia-se a partir de folhas infectadas, com a presença de pústulas ativas responsáveis pela produção de esporos. Esses são facilmente dispersos pelo vento e entram em contato com folhas saudáveis. Na presença de temperaturas amenas entre 20 e 23 °C, associadas à elevada umidade relativa do ar e à presença de molhamento foliar contínuo por várias horas, os esporos germinam em até 24 horas, formando tubos germinativos, estruturas que penetram os estômatos da folha. Após a penetração, o fungo coloniza o apoplasto dos tecidos foliares, estabelecendo uma relação biotrófica, na qual passa a absorver nutrientes das

células hospedeiras dentro de 10 dias (Figura 6). Essa fase compromete a síntese de clorofila, manifestando-se visualmente como áreas cloróticas na face adaxial da folha.

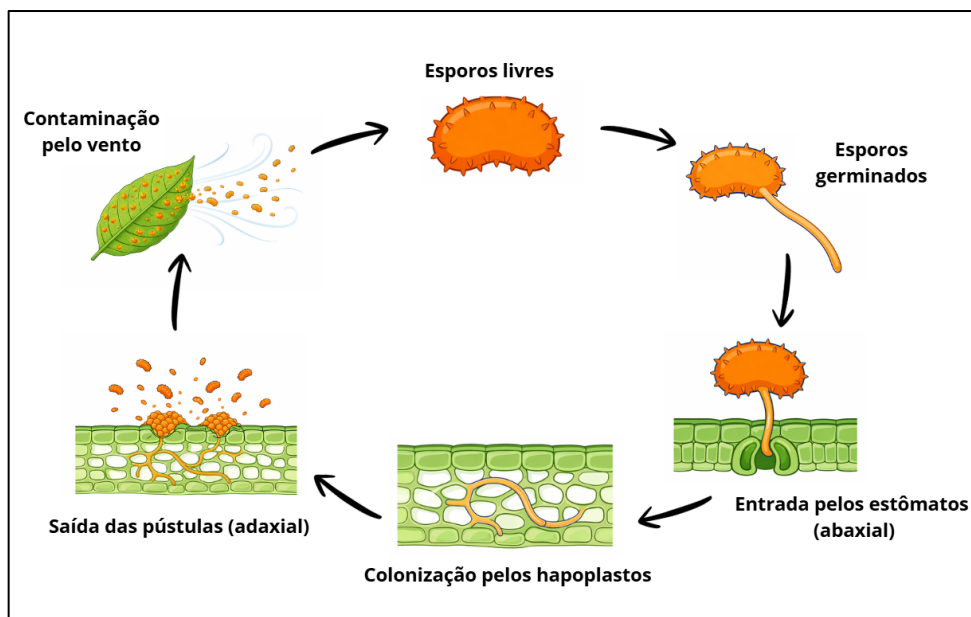


Figura 6. Ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*.

À medida que a colonização avança entre 15 e 20 dias, o micélio se desenvolve internamente e, posteriormente, emerge na face abaxial da folha, formando estruturas reprodutivas. Nesse estágio inicial da esporulação, tornam-se visíveis pequenas pústulas no centro da lesão clorótica. Com a progressão da infecção, as estruturas reprodutivas aumentam gradualmente de tamanho, do centro para as extremidades da lesão, originando pústulas de coloração alaranjada características da ferrugem. O contínuo consumo de nutrientes leva à degeneração dos tecidos, resultando em necrose das áreas afetadas ao longo de 30 dias. Em estágios avançados, a perda funcional da folha culmina em sua queda precoce, encerrando o ciclo da doença e contribuindo para a manutenção do inóculo no ambiente (Bekele, 2022; Ramírez-Camejo et al., 2022; Talhinhos et al., 2017; Avelino et al., 2015).

Do ponto de vista biológico, os esporos representam um estágio sensível do patógeno. Suas membranas são ricas em lipídios, o que os torna suscetíveis a compostos que afetam a integridade celular, como os monoterpenos presentes em óleos essenciais. Os quais têm demonstrado potencial antifúngico, principalmente pela inibição da germinação dos esporos (Pedroso et al., 2024). Apesar disso, ainda são poucos os estudos que avaliam o uso de óleos essenciais *in planta* no controle da ferrugem do cafeeiro. Faltam informações sobre dose, momento de aplicação e eficácia em condições próximas às de campo.

No manejo convencional da ferrugem do cafeeiro, fungicidas à base de estrobilurinas, triazóis e antibióticos agrícolas são amplamente utilizados como referência de eficiência no controle da doença (Cabral et al., 2022; Athina Koutouleas, 2023). Esses produtos são frequentemente empregados como controles positivos em estudos experimentais, permitindo a comparação da resposta de novas alternativas, como bioinsumos, com práticas consolidadas no manejo fitossanitário.

2.5 Mancha aureolada causada por *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*

A mancha-aureolada do cafeeiro, causada por *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, é uma das principais doenças bacterianas que afetam viveiros e lavouras jovens de *Coffea arabica* (Figura 7).



Figura 7. Lesões típicas de Mancha aureolada em folhas de *Coffea arabica*.

A doença causa perda de vigor, desfolha e atraso no desenvolvimento das plantas. O patógeno pertence ao complexo *Pseudomonas syringae* e apresenta alta capacidade de sobreviver na superfície das folhas.

O ciclo da doença inicia-se a partir de folhas infectadas ainda aderidas à planta ou já caídas no solo, que atuam como importantes fontes de inóculo. A disseminação ocorre

principalmente por chuva, neblina e respingos de água, que promovem a redistribuição da bactéria e favorecem a formação de microferimentos em folhas saudáveis. Em seguida a bactéria atinge a superfície foliar e pode permanecer por períodos prolongados nessa condição (Calixto et al., 2025; Freitas 2017; Morris et al., 2019). A penetração nos tecidos vegetais ocorre em até 1 dia pela face abaxial das folhas, por meio dos estômatos ou de ferimentos (Figura 8).

Uma vez no interior do tecido vegetal, *P. coronafaciens* pv. *garcae* coloniza o apoplasto das células e inicia sua multiplicação. Entre 2 e 4 dias após a infecção, surgem os primeiros sintomas visíveis, caracterizados por pequenos pontos escuros ou levemente encharcados. Com o avanço da colonização, a bactéria ativa mecanismos de virulência, com destaque para o sistema de secreção do tipo III, responsável pela injeção de efetores e pela supressão das defesas da planta. Entre 4 e 7 dias, as lesões aumentam de tamanho e passam a apresentar aspecto encharcado mais evidente (Patrício et al., 2021; Raimundi et al., 2021; Rodrigues et al., 2015), conforme Figura 8.

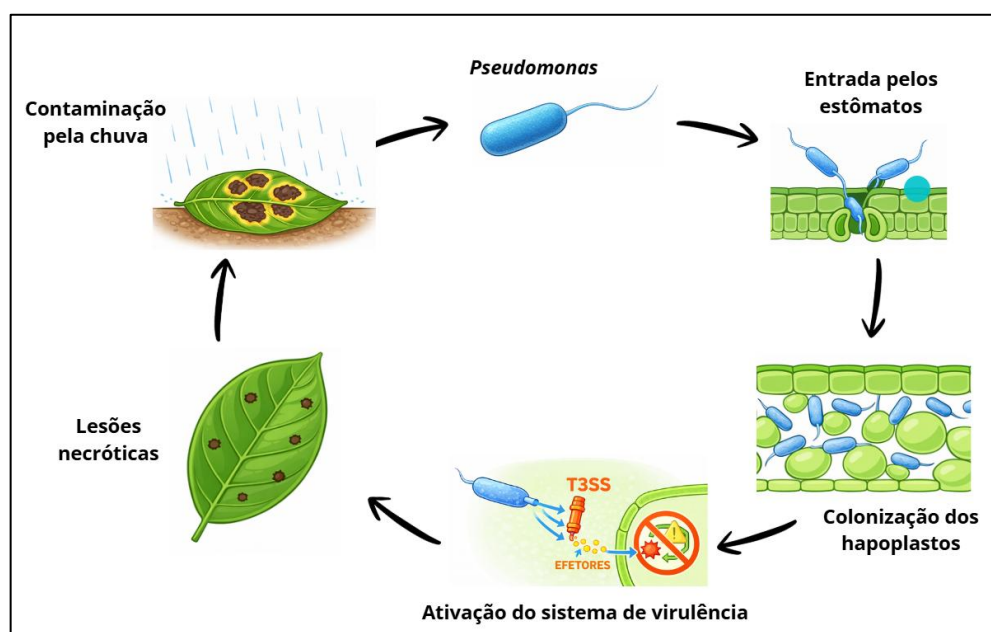


Figura 8. Ciclo de vida da *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* em folhas de *Coffea arabica*.

Entre 7 e 10 dias após a infecção, ocorre a formação de necrose central acompanhada por um halo amarelado característico na face adaxial da folha. Esse halo resulta da clorose induzida pela ação de toxinas e efetores bacterianos, que comprometem o metabolismo e a fotossíntese das células adjacentes à lesão. Em condições favoráveis e sob alta pressão de inóculo, a doença atinge a fase avançada (≥ 10 dias), com coalescência das lesões,

enfraquecimento do tecido foliar e queda precoce das folhas, comprometendo o vigor das plantas e a produtividade do cafeeiro (Patrício et al., 2021; Raimundi et al., 2021; Rodrigues et al., 2015).

O manejo da mancha-aureolada baseia-se em medidas preventivas, uma vez que a doença é favorecida por condições ambientais específicas, especialmente alta umidade, ventos e ferimentos nos tecidos vegetais. Entre as principais estratégias de controle destacam-se a produção de mudas saudáveis em viveiros protegidos, a utilização de quebra-ventos para reduzir danos mecânicos e a disseminação do patógeno, além da adoção de práticas culturais que minimizem condições favoráveis à infecção. Essas medidas são fundamentais para reduzir a incidência da doença e os prejuízos associados à cultura do cafeeiro. O uso de bactericidas à base de cobre também é empregado no manejo da doença; entretanto, sua eficácia pode ser variável e há risco de fitotoxicidade, especialmente em plantas jovens (Freitas, 2017).

2.6 Bioinsumos

A agricultura passa por um processo de transição. O uso intensivo de pesticidas químicos, embora eficiente no curto prazo, tem sido cada vez mais limitado por questões ambientais, regulatórias, econômicas e sociais. Esse cenário tem impulsionado a busca por alternativas sustentáveis para o manejo de doenças agrícolas, entre elas os bioinsumos (Barbosa et al., 2025). As pressões regulatórias têm papel central nessa mudança. A União Europeia estabeleceu metas para a redução do uso de pesticidas químicos, impactando diretamente países exportadores de commodities agrícolas, como o Brasil (Beckman, 2022). Além disso, organismos internacionais destacam que a adoção de insumos de menor impacto ambiental é essencial para atender às metas globais de sustentabilidade.

No Brasil, esse movimento é reforçado por políticas públicas que estimulam a pesquisa, produção e uso de bioinsumos (Brasil, 2020; CBI, 2024; FAO, 2023). O Programa Nacional de Bioinsumos, lançado pelo MAPA em 2020, incentiva o uso de insumos biológicos para aumentar a produtividade agrícola e reduzir impactos ambientais (Barbosa, 2025). Além das pressões regulatórias, fatores econômicos e de mercado contribuem para a adoção de bioinsumos. No setor cafeeiro, a recorrência de doenças, aliada ao aumento do custo de defensivos químicos e ao risco de seleção de patógenos resistentes, eleva o custo de produção e reduz a eficiência do manejo convencional (Avelino et al., 2015; Beckman et al., 2022; Brasil, 2020). Ao mesmo tempo, mercados de cafés especiais e certificados impõem restrições ao uso

de moléculas sintéticas, favorecendo insumos com menor produção de resíduos e impacto ambiental. Nesse cenário, os bioinsumos de origem vegetal, especialmente os óleos essenciais, ganham destaque (Ahmed et al., 2023; CBI, 2024).

Esses compostos apresentam atividade antimicrobiana, rápida degradação no ambiente e baixo acúmulo de resíduos. Sua diversidade química permite aplicações em diferentes sistemas planta–patógeno, o que amplia seu potencial de uso no manejo sustentável de doenças agrícolas. Paralelamente, observa-se um avanço tecnológico importante. Óleos essenciais têm sido incorporados a formulações mais estáveis, como emulsões e sistemas carreadores, com o objetivo de aumentar sua persistência e eficácia em condições de campo (Christova et al., 2024; Dunan et al., 2023; Ziedan et al., 2022).

Esse movimento demonstra que esses compostos estão deixando de ser apenas objetos de estudo acadêmico e passam a integrar soluções com potencial de aplicação prática. Apesar desse avanço, desafios permanecem. A variabilidade da composição química, a influência dos quimiotipos, a volatilidade e a dificuldade de definir doses e momentos ideais de aplicação ainda limitam a adoção ampla desses produtos. Essas lacunas reforçam a necessidade de estudos *in planta*, capazes de integrar a interação entre composto natural, patógeno e planta hospedeira.

Além da escolha do composto e da dose, o momento de aplicação é um fator determinante para a eficiência de bioinsumos no manejo de doenças foliares. Tratamentos preventivos correspondem às aplicações realizadas antes da infecção, com o objetivo de reduzir o estabelecimento do patógeno e o inóculo inicial. Essa estratégia é amplamente utilizada no manejo integrado de doenças, especialmente no uso de bioinsumos, que tendem a apresentar melhor desempenho quando aplicados de forma antecipada.

Tratamentos curativos referem-se às aplicações realizadas após o início da infecção ou ao aparecimento dos primeiros sintomas da doença, com o objetivo de reduzir o progresso da patogênese e limitar os danos à planta. A eficiência dessa abordagem depende fortemente da rapidez da intervenção, sendo maior quando aplicada nos estágios iniciais da infecção. A avaliação comparativa dessas estratégias é fundamental para compreender o potencial de óleos essenciais em condições *in planta* e orientar sua aplicação no manejo sustentável de doenças do cafeeiro.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Parte-se da hipótese de que óleos essenciais dos diferentes quimiotipos de *Lippia alba* apresentam efeito sobre patógenos do cafeeiro, evidenciado previamente por sua atividade antimicrobiana em ensaios *in vitro* contra outros patógenos e avaliado, neste estudo, em condições *in vitro* e *in planta*. Assume-se que esse efeito pode variar em função do quimiotipo do óleo essencial, da dose aplicada e do momento de aplicação, resultando em diferentes níveis de controle da doença. Considerando que o trabalho envolve dois patógenos com ciclos biológicos distintos, *Hemileia vastatrix*, um fungo biotrófico estrito de ciclo longo, e *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, uma bactéria de ciclo rápido, pressupõe-se que a resposta aos tratamentos possa diferir entre as doenças avaliadas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de óleos essenciais de diferentes quimiotipos de *Lippia alba* sobre *Hemileia vastatrix* e *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, por meio de ensaios *in vitro* e *in planta*, considerando a influência do quimiotipo, da dose e do momento de aplicação (preventivo e curativo) na eficiência de controle das doenças.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do óleo essencial de *Lippia alba*

4.1.1 Critério de seleção dos acessos de *Lippia alba*

Para obter o óleo essencial, foram coletados diferentes acessos (linhagens de plantas que possuem uma identidade genética única) de *Lippia alba* pertencentes ao Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico, em Campinas (IAC). A seleção dos acessos seguiu critérios diferentes para cada patógeno, baseando-se em hipóteses teóricas e em dados de triagens biológicas anteriores conduzidas pela Marina Erê. Para o fungo *Hemileia vastatrix*, o desenho experimental baseou-se na hipótese de sinergismo dos compostos majoritários (citrал e mirceno), com base no potencial biológico previamente observado contra *Candida albicans*. Já para a bactéria *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, os tratamentos foram selecionados a

partir dos resultados mais promissores obtidos em uma triagem prévia de óleos essenciais (Tabela 1).

Tabela 1. Critério de seleção dos acessos de óleos essenciais de *Lippia alba*.

Acesso	Quimiotipo	Patógeno Alvo	Triagem	Ensaio
LA-108	Citral	<i>Hemileia vastatrix</i>	Não	<i>In vitro / In planta</i>
LA-129	Mirceno	<i>Hemileia vastatrix</i>	Não	<i>In vitro / In planta</i>
LA-132	Citral/Mirceno	<i>Hemileia vastatrix</i>	Não	<i>In vitro / In planta</i>
LA-42	Linalol	<i>Pseudomonas coronafaciens pv.garcae</i>	Sim	<i>In vitro / In planta</i>
LA-132	Citral/Mirceno	<i>Pseudomonas coronafaciens pv.garcae</i>	Sim	<i>In vitro / In planta</i>

Legenda: Esta tabela resume a estratégia de seleção dos acessos avaliados na pesquisa. A primeira coluna apresenta o código do acesso; a segunda indica o quimiotipo (o composto químico que domina o óleo essencial); a terceira aponta o patógeno alvo testado. A quarta coluna sinaliza se a escolha foi baseada em uma triagem prévia (testes anteriores que comprovaram a eficácia daquele óleo específico) ou se partiu de uma hipótese inédita.

4.1.2 Coleta dos acessos de *Lippia alba*

As plantas selecionadas eram adultas e cultivadas em condições rústicas no campo experimental do IAC, localizado em Campinas, SP, Brasil. A região apresenta clima subtropical úmido do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen-Geiger, caracterizado por verões quentes e chuvosos e invernos secos, com temperatura média anual em torno de 22 °C e precipitação anual aproximada entre 1.300 e 1.500 mm, conforme dados institucionais da região (Beck et al., 2018). As coletas foram realizadas nos anos de 2024 e 2025, sempre no período da manhã, utilizando folhas maduras e totalmente expandidas, sob temperatura ambiente entre 25 e 30 °C.

Foram coletados ramos de aproximadamente 30 cm, e acondicionados em caixas plásticas, sendo posteriormente submetidos à secagem natural durante sete dias em casa de vegetação, onde as amostras permaneceram sobre bancada, em ambiente com temperatura entre 25 e 30 °C, sem controle de umidade relativa ou luminosidade (Figura 9).



Figura 9. Coleta do material vegetal de *Lippia alba*. **a.** Ramos em caixas plásticas submetidos à secagem natural; **b.** Ramos secos; **c.** Sacos plásticos com folhas maceradas.

Após a secagem, as folhas foram separadas manualmente dos galhos e maceradas até a obtenção de fragmentos pequenos e homogêneos. O material seco foi armazenado em sacos plásticos devidamente identificados de acordo com o acesso. Em seguida foram encaminhados ao Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agrônomo, em Campinas (IAC) para a extração do óleo essencial.

4.1.3 Extração do óleo essencial

Para cada extração de óleo essencial, aproximadamente 80g de folhas maceradas foram transferidas para um balão de fundo redondo de vidro borossilicato, contendo aproximadamente 1000 mL de água destilada à temperatura ambiente. A extração foi realizada por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger acoplado a condensador reto refrigerado por circulação contínua de água mantida em baixa temperatura, com adição periódica de gelo (Figura 10).

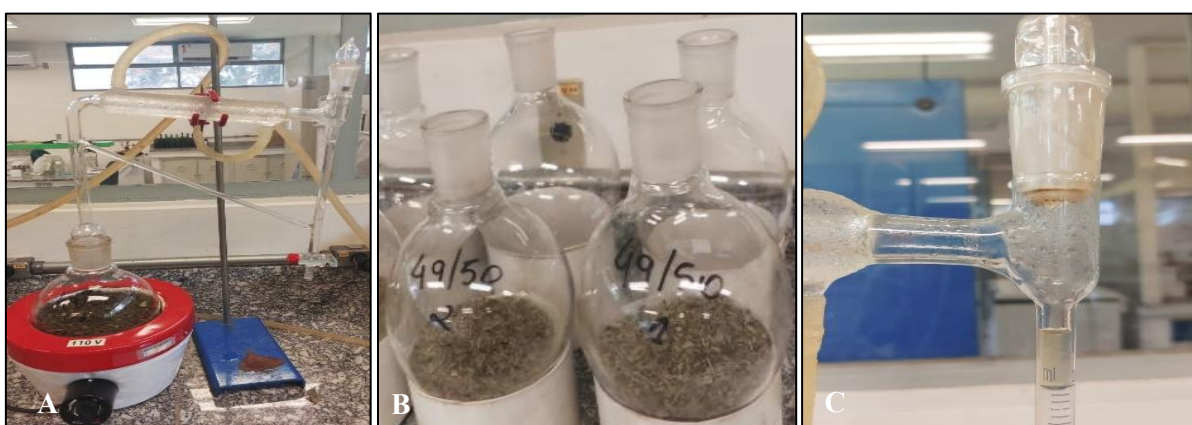


Figura 10. Extração do óleo essencial de *Lippia alba*. **a.** Clevenger; **b.** Balões de vidro com folhas maceradas; **c.** Óleo essencial extraído.

O sistema foi aquecido em manta térmica até o início da ebulição. Após o início da ebulição, o conjunto foi mantido sob refluxo contínuo por 2 horas, período previamente determinado como necessário para a estabilização do volume de óleo essencial coletado em ensaios preliminares. Ao final da destilação, a fase oleosa foi separada da fase aquosa por decantação. O óleo essencial bruto foi coletado com micropipetas e transferido para frascos de vidro âmbar, os quais foram armazenados em freezer doméstico ($\approx -18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Depois calculou-se o rendimento do óleo essencial, expresso em porcentagem (massa/massa).

4.1.4 Perfil Químico de Óleos Essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para a identificação e quantificação dos compostos voláteis dos óleos essenciais (OEs), foi realizada uma análise por CG-EM utilizando os sistemas Thermo GC TRACE 1310 e Shimadzu QP2010 ULTRA, equipados com detector de ionização em chama (DIC) e espectrômetro de massas (EM), operando com uma razão de divisão de fluxo (split) de 3:7 para o EM e o DIC, respectivamente. O injetor foi mantido a $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ com uma razão de divisão de fluxo (split) de 1:20 para o gás de arraste (hélio, grau de pureza de 99,9999%). A separação das substâncias foi realizada em uma coluna capilar TR-5M ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$), seguindo uma programação de temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) e uma vazão do gás de arraste hélio de 1 mL min^{-1} .

O espectrômetro de massas (EM) operou em modo de varredura completa (full scan), com impacto eletrônico de 70 eV e uma faixa de aquisição de 40 a 450 m/z . A temperatura da interface foi mantida em aproximadamente $240\text{ }^{\circ}\text{C}$, e o detector de ionização em chama foi aquecido a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por meio de análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com a biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST 14) e índices de retenção da literatura (Adams, 2017). Os índices de retenção foram calculados a partir da injeção de uma mistura de n-alcanos (C9-C24, Sigma EUA) sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, aplicando a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

4.2 Ensaios com *Hemileia vastatrix*

4.2.1 *In vitro*

4.2.1.1 Delineamento experimental

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O arranjo experimental foi disposto em esquema fatorial 3 x 5 + 2, composto pela combinação de três óleos essenciais, cinco concentrações e dois tratamentos adicionais (controles positivo e negativo), totalizando 17 tratamentos, com 3 repetições cada. Os óleos essenciais foram incorporados ao meio de cultura ainda quente antes do vertimento nas placas de Petri. Após a solidificação do meio, cada placa recebeu a inoculação de dos esporos do patógeno. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio de cultura, e como controle positivo, o fungicida comercial Opera®, servindo como referência biológica para a interpretação dos resultados.

Tabela 2. Esquema do delineamento (DIC) para os tratamentos *in vitro*.

Tratamentos	0,0125%	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%
LA-108	3	3	3	3	3
LA-129	3	3	3	3	3
LA-132	3	3	3	3	3
CP	-	-	-	-	-
CN	-	-	-	-	-

Legenda: LA-108 (citral), LA-129 (mirceno), LA-132 (citral/mirceno). Controle negativo (CN): Meio de cultura + patógeno. Controle positivo (CP): Meio de cultura + produto comercial de referência + patógeno. De 0,0125% a 0,2% são as concentrações avaliadas.

4.2.1.2 Obtenção do inóculo, preparo e viabilidade

Os esporos de *Hemileia vastatrix* foram coletados da coleção BAG do centro de café do IAC, identificados como raças II (v5), I (v2v5), III (v1v5) e XV (v4v5). Uma vez que o patógeno é classificado como biotrófico obrigatório e não pode ser cultivado em meio de cultura artificial. A dependência de tecido vegetal vivo para sua multiplicação inviabiliza a manutenção do fungo em condições de laboratório, tornando necessária a obtenção direta do inóculo a partir de folhas infectadas. Folhas de cafeeiro foram selecionadas com base na intensidade dos sintomas, priorizando-se pústulas maduras de coloração alaranjada e ausência de coinfeções visíveis (Figura 11).

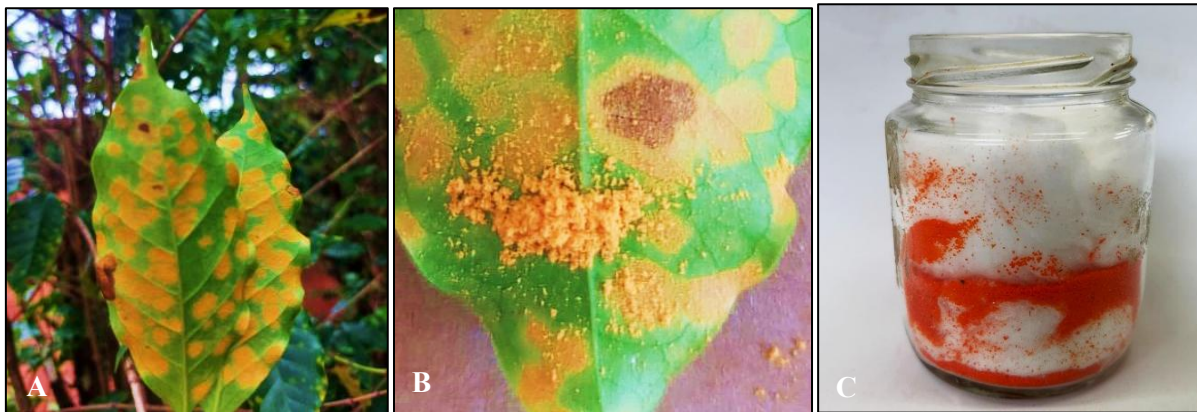


Figura 11. Coleta dos esporos de *Hemileia vastatrix*. **a.** Folhas de *Coffea arabica* com ferrugem; **b.** Esporos soltos; **c.** Dicromato de potássio.

As folhas foram coletadas em sacos de papel e transportadas ao laboratório, onde os esporos foram imediatamente raspados da superfície foliar com pipeta Pasteur com extremidade cortada e transferidos para microtubos tipo Eppendorf. Para armazenamento de curto a médio prazo, os esporos foram mantidos em dicromato de potássio, acondicionados com uma pequena camada de algodão e conservados sob refrigeração entre 2 e 8 °C até o momento do uso experimental.

Antes de iniciar o experimento *in vitro*, realizou-se o ensaio de viabilidade dos esporos para confirmar se o lote estava viável para prosseguir com o experimento. Uma alíquota de esporos foi distribuída sobre uma lâmina contendo 50 µL de água destilada e incubada em câmara úmida a 22 °C por 24 horas. Após a incubação, a lâmina foi avaliada em microscópio óptico (40×) (Figura 12).

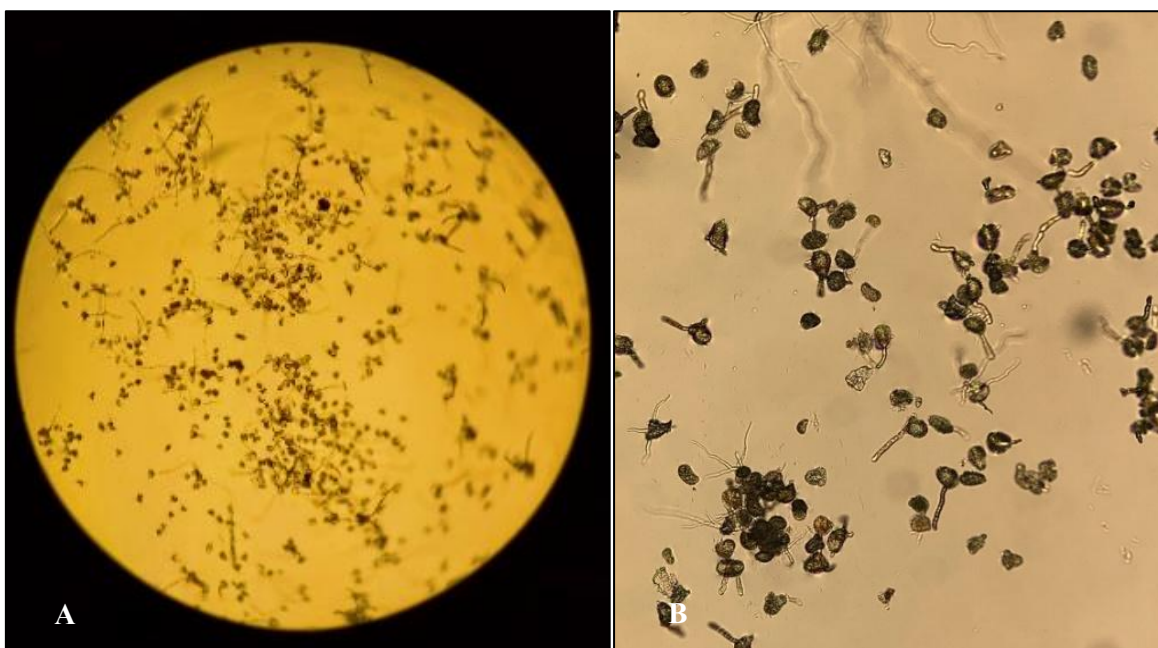


Figura 12. Viabilidade dos esporos de *Hemileia vastatrix*. **a.** Visão do microscópio óptico (40×); **b.** Campo de visão ampliado.

Foram analisados três campos de visão, contabilizando-se 100 esporos por campo, incluindo esporos germinados e não germinados. O critério utilizado para germinação considerou a emissão do tubo germinativo com comprimento igual ou superior ao diâmetro do esporo como critério de viabilidade. Após a avaliação da viabilidade, foi preparada a suspensão de esporos destinada aos ensaios de atividade antifúngica. A concentração da suspensão de esporos foi determinada por contagem direta sob microscópio óptico, contabilizando-se os esporos presentes em quatro quadrantes grandes da grade. A concentração foi calculada a partir da média do número de esporos por quadrante, considerando o volume correspondente a cada quadrante grande da câmara de Neubauer (1×10^{-4} mL).

4.2.1.3 Avaliação da atividade antifúngica sobre os esporos de *Hemileia vastatrix*

Os ensaios *in vitro* foram conduzidos no Instituto Biológico de Campinas. Foram avaliados a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* sobre os esporos de *Hemileia vastatrix*. Sendo possível dois resultados, atividade fungistática, é a capacidade de inibir o crescimento e a atividade fungicida, a capacidade de matar o fungo. O meio de cultura ágar-ágar foi preparado com 7,5g de ágar e 0,2g de Pentabiótico® Veterinário (para evitar contaminação bacteriana), dissolvidos em 500 mL de água destilada, seguido de esterilização

em autoclave (121 °C por 20 min) e resfriamento até aproximadamente 40 °C, temperatura que permite a incorporação dos óleos essenciais sem volatilização excessiva. Os óleos essenciais foram incorporados diretamente ao meio de cultura com o objetivo de promover sua distribuição homogênea e garantir o contato direto e contínuo com os esporos durante o processo de germinação. A quantidade de óleo essencial para cada concentração, foi calculada para as 3 repetições e depois distribuídas para cada poço da placa de ELISA, no qual comporta 5 ml (Tabela 3).

Tabela 3. Volume total de óleo essencial incorporado ao meio de cultura para as 3 repetições.

Concentração (% v/v)	Volume de óleo essencial (uL)	Meio de cultura (mL)
0,0125	1,8	15
0,025	3,75	15
0,05	7,5	15
0,1	15	15
0,2	30	15

Legenda: (% v/v): volume de óleo essencial adicionado em relação ao volume final do meio de cultura. Volume de óleo essencial (uL): volume adicionado ao meio de cultura para obtenção das concentrações finais avaliadas (% v/v). Meio de cultura (ml): volume total de meio de cultura para as 3 repetições.

Em seguida, foi adicionada água nas colunas sem meio de cultura, apenas para manter a umidade interna das placas, favorecendo a germinação dos esporos, sem participação experimental. Após a distribuição, as placas foram mantidas em repouso até a completa solidificação do meio de cultura. Após a solidificação, foram inoculados 100 µL da suspensão de esporos na superfície de cada poço. As placas inoculadas foram cobertas com papel-jornal para favorecer o escurecimento total e incubadas em câmara BOD a 22 °C por 24 horas.

4.2.2 *In planta*

4.2.2.1 Obtenção das mudas de *Coffea arabica* para ensaios *in planta*

As mudas foram obtidas do centro de café do Instituto Agronômico de Campinas. Apresentavam desenvolvimento vegetativo uniforme, ausência de sintomas visíveis de doenças e número semelhante de folhas. As mudas foram cultivadas em tubetes individuais contendo substrato comercial apropriado para cafeeiro e irrigadas regularmente (Figura 13).



Figura 13. Mudas de *Coffea arabica*.

Para os ensaios envolvendo a ferrugem do cafeeiro, foram utilizadas mudas do cultivar Bourbon Amarelo J9, selecionado por apresentar maior suscetibilidade à doença, favorecendo o adequado estabelecimento da infecção. Para os ensaios com a mancha aureolada, utilizaram-se mudas da cultivar Catuaí Amarelo IAC62 material de referência adotado pelo grupo de pesquisa, amplamente caracterizado em estudos anteriores. As mudas só foram utilizadas no experimento quando atingiram 6 meses de idade.

4.2.2.2 Delineamento experimental

Os ensaios *in planta* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial $3 \times 3 \times 2$, correspondente a três óleos essenciais, três concentrações e dois momentos de aplicação. Adicionalmente, foram incluídos dois controles: controle positivo - CP (tratamento com produto comercial Opera®), utilizados como referência biológica e controle negativo - CN (plantas inoculadas sem nenhum tratamento), conforme Tabela 4.

Tabela 4. Delineamento inteiramente casualizado (DIC) *in vitro* para *Hemileia vastatrix*

Tratamento	Aplicação	0,0125%	0,05%	0,1%
LA-108	Preventivo	6	6	6
LA-129	Preventivo	6	6	6
LA-132	Preventivo	6	6	6
LA-108	Curativo	6	6	6
LA-129	Curativo	6	6	6
LA-132	Curativo	6	6	6
CP	Preventivo	-	-	-
CN	-	-	-	-

Legenda: Os números 6 na tabela representam a quantidade de repetições utilizadas por tratamento. Preventivo: Aplicação dos óleos essenciais ou do controle positivo realizada antes da inoculação com *Hemileia vastatrix*. Curativo: Aplicação dos óleos essenciais realizada após a inoculação com o patógeno. CP (Controle Positivo): Fungicida comercial Opera® aplicado de forma preventiva. CN (Controle Negativo): Mudanças inoculadas apenas com o patógeno, sem a aplicação de tratamentos fungicidas ou óleos.

Cada muda constituiu uma unidade experimental, sendo utilizadas seis por tratamento. Em cada uma, quatro folhas foram selecionadas para inoculação e avaliação (Figura 17), sendo consideradas subamostras para obtenção da média.

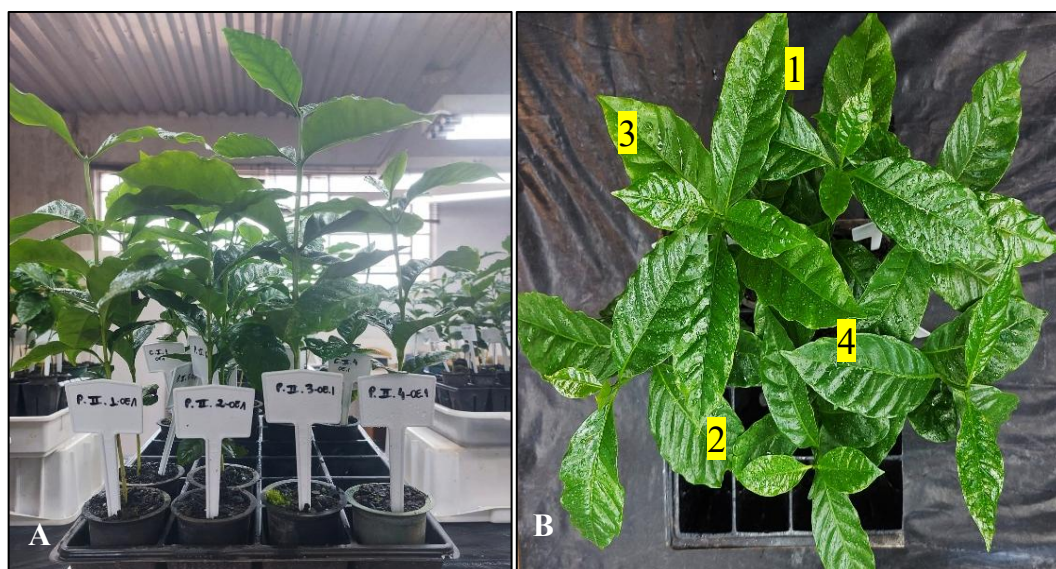


Figura 14. Distribuição das plantas no delineamento experimental. **a.** Distribuição das plantas nas bandejas; **b.** Folhas selecionadas.

4.2.2.3 Preparo dos óleos essenciais de *Lippia alba* para aplicação

O preparo dos óleos essenciais foi conduzido no centro de genética LABIPLAM do Instituto Agrônomo em Campinas. Preparou-se uma emulsão óleo-em-água para permitir a

dispersão homogênea dos óleos essenciais em meio aquoso. Foram usados Tween 80, óleos essenciais e água destilada, armazenados em tubos falcon (Figura 15).

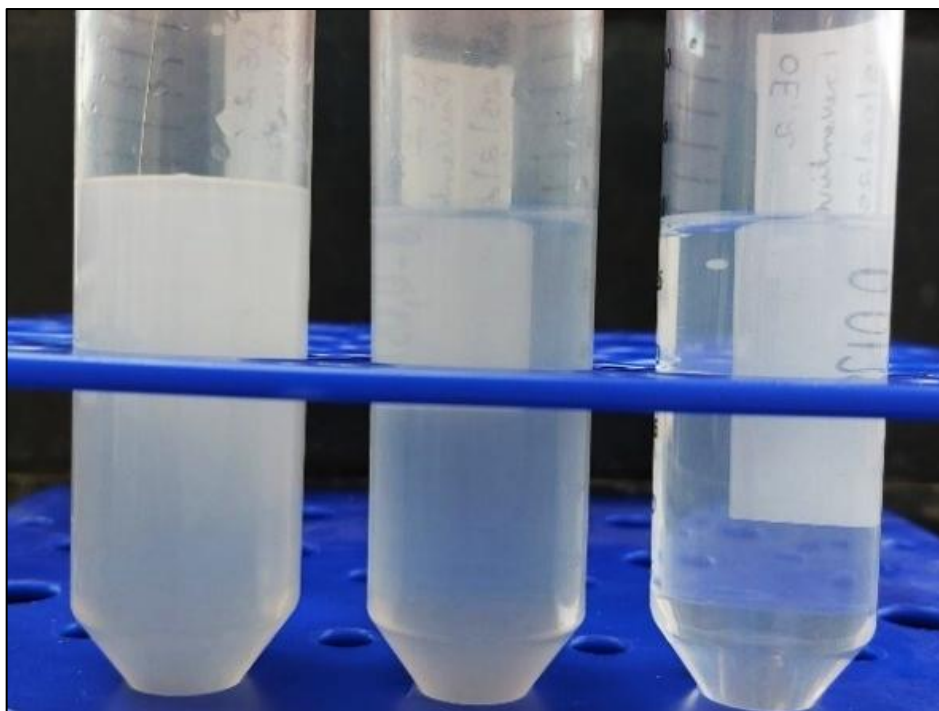


Figura 15. Emulsões de óleo essencial de *Lippia alba* da mais concentrada 0,2%, 0,05% e 0,0125% respectivamente.

Essa emulsão foi homogeneizada em vórtex e mantido sob refrigeração (8°C) até o momento da aplicação. O preparo foi feito igualmente para as duas aplicações, preventiva e curativa. E reproduzidas para cada óleo essencial respectivo o seu acesso (LA-108, LA-129 e LA-132). As quantidades usadas de cada ingrediente seguem na Tabela 5.

Tabela 5. Formulação utilizada para o preparo de 30 mL de cada emulsão.

Componentes	Função	0,0125%	0,05%	0,2%
Tween 80	Emulsificante	3,75uL	15uL	60uL
Óleo essencial	Antifúngico	3,75uL	15uL	60uL
Água destilada	Veículo	30mL	30mL	30mL

Legenda: Tween 80: Utilizado como agente emulsificante (tensoativo). Óleo essencial: Ingrediente ativo antifúngico. Água destilada: Veículo aquoso da formulação. Os volumes estão expressos em mililitros (mL) e microlitros (uL). O volume da formulação aplicado foi de 5 mL por muda, totalizando 30 mL por tratamento (6 repetições). O consumo total de óleo essencial para o preparo das concentrações avaliadas de cada acesso de *Lippia alba* foi de 78,75mL.

4.2.2.4 Aplicação dos óleos essenciais nas folhas de Bourbon Amarelo

Foram iniciados os experimentos quando as mudas atingiram 6 meses de idade. Todas elas foram mantidas em sala de incubação com temperatura mantida controlada a 22°C por meio de condicionador de ar, com fotoperíodo ajustado para 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os tratamentos foram definidos como preventivo e curativo em função do momento de aplicação dos óleos essenciais de *Lippia alba* em relação à inoculação do patógenos *Hemileia vastatrix*. O tratamento preventivo foi realizado por meio da aplicação dos óleos essenciais 24 horas antes da inoculação dos patógenos, com o objetivo de avaliar o efeito dos compostos quando aplicados previamente ao contato entre planta e patógeno. Já o tratamento curativo, foi realizado por meio da aplicação dos óleos essenciais 24 horas após a inoculação, quando o processo infeccioso já havia sido iniciado, permitindo avaliar o efeito dos óleos essenciais quando aplicados após o estabelecimento inicial da infecção. As aplicações foram feitas nas faces abaxial e adaxial das folhas (Figura 16).

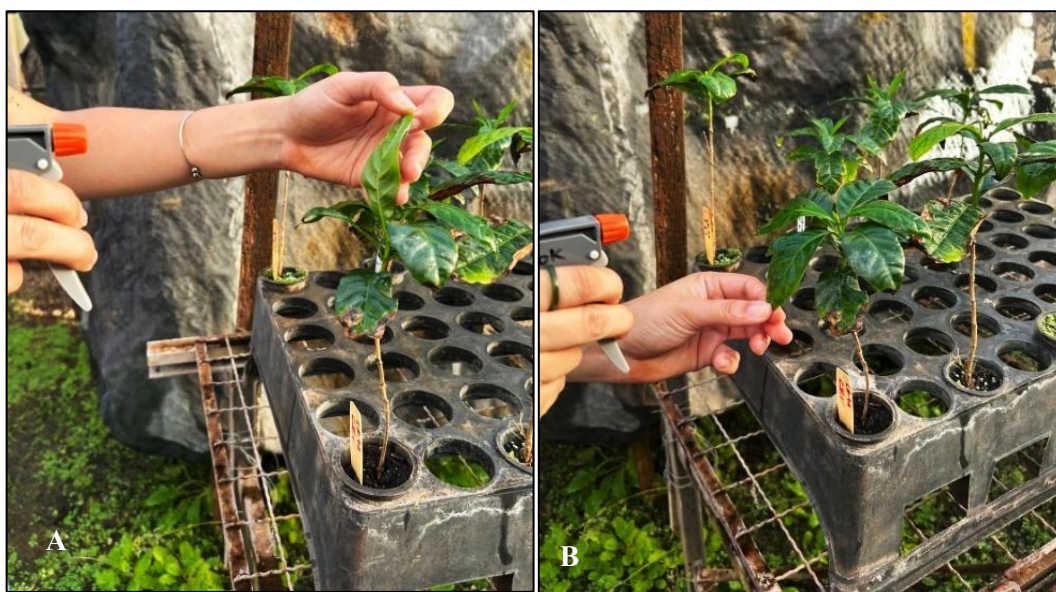


Figura 16. Aplicação dos óleos essenciais de *Lippia alba* nas folhas utilizando pulverizador manual. **a.** Parte abaxial da folha; **b.** Parte adaxial da folha.

Embora a penetração inicial de *H. vastatrix* ocorra predominantemente pela face abaxial, em função da maior densidade estomática, a pulverização em ambas as faces assegurou a formação de um filme contínuo do tratamento, reduzindo falhas de cobertura e limitando o avanço do patógeno pelos tecidos foliares. A pulverização foi padronizada com o uso de

pulverizador manual, aplicando-se dois jatos por face foliar. Esse número foi previamente determinado por fornecer cobertura homogênea, sem causar escorrimento excessivo, garantindo volumes equivalentes entre os tratamentos. O modo de aplicação foi idêntico para os tratamentos preventivos e curativos, diferindo apenas no momento da aplicação em relação à inoculação do patógeno.

4.2.2.5 Inoculação de *Hemileia vastatrix* nas folhas de Bourbon Amarelo

Foram preparadas as suspensões de esporos de *Hemileia vastatrix* no LABIPLAM do centro de genética do IAC e levados para a sala e incubação. Foram usados os esporos que estavam armazenados em dicromato de potássio. Realizou-se a pesagem direta do inóculo, utilizando-se 1 mg de esporos por mL de água destilada. Como havia 108 plantas, 432 folhas, então preparou-se 432mg de esporos para 432 mL de água destilada.

A inoculação foi realizada pela aplicação de 1 mL da suspensão de esporos diretamente na face abaxial das folhas das mudas, utilizando pulverizador manual pressurizado, a fim de promover a deposição uniforme da solução sobre a superfície foliar. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em bandejas cobertas com sacos plásticos pretos previamente umedecidos, permanecendo em ambiente escuro e com elevada umidade relativa por 24 horas, condições favoráveis à germinação dos esporos e à penetração pelos estômatos foliares (Figura 17). Em seguida, os sacos plásticos foram removidos, e as plantas mantidas sob fotoperíodo de 12 horas, com iluminação LED, até o aparecimento dos primeiros sintomas.



Figura 17. Etapas da inoculação de *Hemileia vastatrix* em folhas de *Coffea arabica*. **a.** Folha inoculada com a suspensão de esporos; **b.** bandejas com mudas cobertas com sacos plásticos pretos.

4.2.2.6 Avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre a ferrugem

A avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre a ferrugem, foi avaliada segundo uma escala de notas de Eskes. No qual através do número de lesões observados é possível estimar a severidade e % de área lesionada (Figura 18).



Figura 18. Escala visual criada como exemplo de padronização na contagem do número de lesões observados.

As observações foram feitas a cada dois dias, até o prazo de 30 dias após a inoculação, quando todos os tratamentos atingiram o nível máximo de severidade de 5 (Tabela 6)

Tabela 6. Escala de notas para avaliação da severidade da doença, adaptada de Lucas (2017) .

Lesões	Ponto	Área lesionada (%)
0	0	0
1 - 2	1	0,6 - 1,3
2 - 4	2	1,3 - 2,5
4 - 8	3	2,5 - 5,2
8 - 15	4	5,2 - 9,7
15 - 29	5	9,7 - 18,5

Legenda: Escala diagramática de notas utilizada para a quantificação da severidade da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). Lesões visíveis: Contagem absoluta do número de pústulas observadas por folha. Severidade: Índice expresso em escala de notas (0 a 5) utilizado como variável resumo para a padronização e análise estatística dos dados. Porcentagem de área foliar lesionada: Proporção da área foliar total ocupada ou colonizada pelas lesões do patógeno.

4.2.2.7 Análise de dados

Para obter os dados de severidade da ferrugem, consideraram-se os seguintes tempos: 18, 26 e 31 dias após a inoculação, quando houve mudanças significativas das lesões. Cada tempo de avaliação foi analisado individualmente por análise de variância (ANOVA), após verificação dos pressupostos de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e

homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Quando constatado efeito significativo dos tratamentos ($p \leq 0,05$), as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A evolução da doença ao longo do período experimental foi analisada por meio da construção das curvas de progressão da severidade. As análises estatísticas foram realizadas no software R, e os gráficos foram elaborados com auxílio do ChatGPT.

4.3 Ensaios com *Pseudomonas coronafaciens pv garcae*

4.3.1 *In vitro*

4.3.1.1 Delineamento experimental

O experimento *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) utilizando microplacas de 96 poços, contendo oito linhas (A–H) e doze colunas (1–12). O delineamento correspondeu a um arranjo fatorial 2×8 , composto por dois acessos de *Lippia alba* LA-42 e LA-132 e oito concentrações, de 2mg/mL até 0,0156 mg/mL na razão 1:2. Como controles, foram incluídos: controle positivo – CP (antibiótico cloranfenicol), controle negativo – CN (meio de cultura + DMSO + inóculo), controle de esterilidade – CE (meio de cultura + DMSO, sem inóculo) e controle do solvente – CS (DMSO $\leq 1\%$).

Tabela 7. Delineamento inteiramente casualizado (DIC) *in vitro* para *Pseudomonas coronafaciens pv garcae*

Linha	Concentrações (mg/mL)	LA-42	LA-132
A	2,0	2	2
B	1,0	2	2
C	0,5	2	2
D	0,25	2	2
E	0,125	2	2
F	0,0625	2	2
G	0,0313	2	2
H	0,0156	2	2
CP	-	-	-
CN	-	-	-
CE	-	-	-
CS	-	-	-

Legenda: Linha: Corresponde às concentrações testadas. Concentrações: Obtidas na diluição seriada. LA-42: Acesso pertencente ao quimiotipo Linalol. L-132: Acesso pertencente ao quimiotipo Citral/Mirceno. Número 2 representa o número de repetições realizadas. CP: controle positivo (antibiótico cloranfenicol). CN: controle negativo (meio de cultura + DMSO + inóculo). CE: Controle de esterilidade (meio de cultura + DMSO, sem inóculo). CS: controle do solvente (DMSO $\leq 1\%$).

4.3.1.2 Preparo da placa de Microdiluição em caldo

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Lippia alba* foi avaliada frente à cepa fitopatogênica *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* (IBSBF 1197) concebida pela Dr. Suzete da UNICAMP e preparada pelo CPQBA de Campinas. Usou-se o método de microdiluição em caldo conforme descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005; M7-A6), com adaptações para fitopatógenos bacterianos. Este ensaio possibilita dois resultados, atividade bacteriostática, é a capacidade de inibir o crescimento da bactéria e a atividade bactericida, é a capacidade de matar.

Foram preparadas emulsões-mãe dos acessos LA-42 e LA-132 a partir de 15 mg do óleo essencial. Posteriormente, foram dissolvidos em solução contendo Tween 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) até completa emulsificação. Em seguida, adicionou-se caldo Mueller Hinton (MHB) para obtenção de uma solução mãe final a 8 mg/mL. Essa solução, foi utilizada para a preparação das diluições seriadas na placa de 96 poços. Cada poço continha 400ul total de volume, sendo 100ul da solução mãe de óleo essencial, 100ul de MHB, e 200ul da suspensão bacteriana a 1×10^6 UFC/mL. Assim a concentração inicial do óleo essencial na linha A foi de 2mg/ml. A partir dessa concentração, foram realizadas diluições seriadas na razão 1:2 ao longo das linhas seguintes (B–H), originando uma faixa de concentrações entre 1 mg/mL e 0,0156 mg/mL. Para cada acesso foram feitas duplicatas. O cálculo utilizado para obter a concentração inicial foi:

$$C_f = C_i \times V_i / V_{\text{total}} \longrightarrow C_f = 8\text{mg/mL} \times 100\text{uL} / 400\text{uL} = 2\text{mg/mL}$$

A suspensão bacteriana foi preparada a partir de cultura jovem, padronizada para 0,5 na escala de McFarland e diluída no MHB até concentração final de 1×10^6 UFC/mL. Os poços das colunas 11 e 12 foram preenchidos com água estéril para minimizar evaporação durante a incubação. Por fim, as placas foram vedadas com Parafilm® e incubadas por 24 h a 28 ± 2 °C, com leitura confirmatória após 48 h.

4.3.1.3 Avaliação da atividade antibacteriana no ensaio de Microdiluição em caldo

Após o período de incubação, foi adicionado 0,5% (20 µL por poço) de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) sobre os poços para a visualização da atividade antibacteriana. Em seguida, as

placas foram incubadas no escuro por três horas. O TTC foi utilizado devido à sua sensibilidade para detecção metabólica e ampla aceitação em ensaios microbiológicos (Bochner, 1989; Chiers et al., 2020). A presença de coloração vermelha indica crescimento bacteriano ativo, enquanto a ausência de coloração sugere inibição completa (Figura 19).

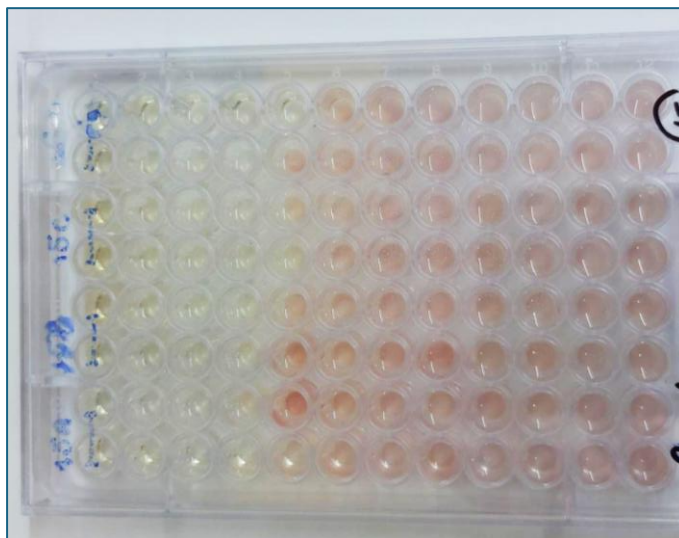


Figura 19. Placa de 96 poços com a presença de coloração vermelha (crescimento bacteriano ativo) e a ausência de coloração (inibição completa).

4.3.1.4 Interpretação dos resultados

Após a visualização de quais óleos essenciais extraídos inibiram o crescimento bacteriano (ausência de coloração vermelha nos poços). Foram identificadas todas as concentrações respectivas. Em seguida, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de impedir completamente o desenvolvimento de coloração vermelha e de turbidez visível no meio. A partir de todas as concentrações que tiveram atividade inibitória, realizou-se um segundo ensaio para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Ou seja, para confirmar se, a mesma concentração para inibir o crescimento bacteriano é a mesma para causar morte bacteriana.

Assim foram feitas alíquotas de 10 μ L dos poços considerados inibitórios e repicadas em placas de ágar Mueller–Hinton, incubadas a 28 °C por 48 horas. A CBM correspondeu à menor concentração capaz de impedir totalmente o crescimento bacteriano nas placas de repique. Os valores de CIM e CBM foram expressos em mg/mL, convertidos posteriormente para μ g/mL conforme densidade de cada óleo essencial. Após a determinação da CIM e CBM

para cada óleo essencial, classificou-se os resultados em categorias de atividade antibacteriana, segundo a classificação proposta por Sartoratto et al. (2004). Ela estabelece categoria alta resultados <500 ug/mL, moderada 500 – 1500 ug/mL ou baixa > 1500 ug/mL.

4.3.2 *In planta*

4.3.2.1 Obtenção das mudas de *Coffea arabica* para ensaios in planta

Para os ensaios com a mancha aureolada, utilizaram-se mudas da cultivar Catuaí Amarelo IAC62 material de referência adotado pelo grupo de pesquisa, amplamente caracterizado em estudos anteriores.

4.3.2.2 Delineamento experimental

Os ensaios *in planta* foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$ correspondentes a dois acessos, duas concentrações e dois momentos de aplicação (Tabela). Adicionalmente, foram incluídos dois controles: controle positivo - CP (tratamento com produto comercial Kasumin®), utilizados como referência biológica e controle negativo - CN (plantas inoculadas sem nenhum tratamento). Cada tratamento foi composto por quatro repetições, sendo uma planta por repetição (Tabela 8).

Tabela 8. Delineamento inteiramente casualizado (DIC) in planta para *Pseudomonas coronafaciens pv garcae*

Acesso	0,025%	0,05%	Aplicação
LA-42	4	4	Preventivo
LA-132	4	4	Preventivo
LA-42	4	4	Curativo
LA-132	4	4	Curativo
CP	4	4	Preventivo
CN	4	4	-

Legenda: O número 4 na tabela representa a quantidade de repetições utilizada por tratamento. Preventivo: Aplicação dos óleos essenciais ou do controle positivo realizada antes da inoculação com *Pseudomonas coronafaciens pv garcae*. Curativo: Aplicação dos óleos essenciais realizada após a inoculação com o patógeno. CP (Controle Positivo): Bactericida comercial Kasumin® aplicado de forma preventiva. CN (Controle Negativo): Mudas inoculadas apenas com o patógeno, sem a aplicação de tratamentos bacterianos.

4.3.2.3 Inoculação de *Pseudomonas coronafaciens pv garcae* nas folhas de Catuai

Amarelo

Inicialmente, preparou-se uma suspensão de *Pseudomonas coronafaciens pv. garcae*, que foi cultivada em meio TSA e transferida para caldo TSB. Posteriormente, foi incubada em estufa tipo BOD a 28 °C por 24 horas, sob agitação constante, até atingir a fase exponencial de crescimento. A suspensão bacteriana foi padronizada para aproximadamente 1×10^8 UFC mL por leitura espectrofotométrica a 600 nm. A inoculação foi realizada nos 4 primeiros pares de folhas, na face abaxial. Por meio de dispositivo de abrasão previamente umedecido na suspensão bacteriana, promovendo microlesões que facilitam a entrada do patógeno.

4.3.2.4 Preparo dos óleos essenciais para aplicação

Para os ensaios com *Pseudomonas coronafaciens pv. garcae*, foram preparados 20 mL da emulsão para cada óleo essencial, concentrações (0,025% e 0,05% v/v) e tipo de aplicação (preventivo e curativo). Para esse volume, as alíquotas de óleo essencial foram de 5 µL (0,025%) e 10 µL (0,05%), complementadas com Tween 80 em volume equivalente ao do óleo e água destilada até 20 mL. Considerando ambos os modos de aplicação, o volume total de óleo essencial utilizado por óleo essencial foi de 30 µL (Tabela 9).

Tabela 9. Componentes e volumes utilizados para cada emulsão nas concentrações testadas.

Componente	Função	0,025%	0,05%
Tween 80	Emulsificante	5uL	10uL
Óleo essencial	Antimicrobiano	5uL	10uL
Água destilada	Veículo	20mL	20mL

Legenda: Tween 80: Utilizado como agente emulsificante (tensoativo). Óleo essencial: Ingrediente ativo antifúngico. Água destilada: Veículo aquoso da formulação. Os volumes estão expressos em mililitros (mL) e microlitros (uL). O volume da formulação aplicado foi de 5 mL por muda, totalizando 20 mL por tratamento (6 repetições). O consumo total de óleo essencial para o preparo das concentrações avaliadas de cada acesso de *Lippia alba* foi de 30uL.

4.3.2.5 Avaliação da atividade dos óleos essenciais sobre a mancha aureolada

Foram avaliados o grau de desenvolvimento da doença em escala de 5 graus, segundo Rodrigues (2017). Considerando-se: grau 1, lesões secas, pequenas e dispersas; grau 2, lesões enxarcadas, pequenas e mais agrupadas; grau 3, lesões enxarcadas, maiores e mais agrupadas; grau 4, lesões enxarcadas ocupando mais da metade da área inoculada; e grau 5, lesões ocupando toda a área inoculada (Figura 20). As avaliações foram realizadas ao longo do tempo até a progressão dos sintomas atingir o grau máximo (nota 5).



Figura 20. Escala ordinal de severidade de 1 a 5. Fonte: Rodrigues (2017).

Os dados obtidos nos ensaios *in planta* foram analisados considerando-se a planta como unidade experimental, com quatro repetições por tratamento. Para cada data de avaliação, a severidade da doença por planta foi estimada pela média das notas atribuídas às quatro folhas avaliadas (F1–F4). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) após verificação dos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias. Quando identificado efeito significativo dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, adotando-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

O progresso temporal da doença foi resumido por meio da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Depois, foi calculada a eficiência dos tratamentos em relação ao controle negativo, expressa em porcentagem de redução da severidade da doença. Para compreender as diferenças entre o momento de aplicação dos óleos essenciais, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando os dados de severidade da doença obtidos nas avaliações realizadas aos 18, 26 e 30 dias após a inoculação. Na análise, foram incluídos todos os tratamentos. Os resultados foram representados por componentes principais (PC1 e PC2), com inclusão de elipses de confiança de 95% para visualização da dispersão dos tratamentos de acordo com o tipo de aplicação. As análises estatísticas foram realizadas através do software RStudio 2026.05.1+225 e auxílio do ChatGPT.

5 RESULTADOS

5.1 Rendimento e Caracterização química dos óleos essenciais

Foram observadas variações no rendimento entre os diferentes acessos avaliados, com valores variando de 0,35% a 1,43%. Para os óleos essenciais usados no controle de *Hemileia vastatrix*, o maior rendimento foi o OEs extraído do acesso LA-108, já para *Pseudomonas coronafaciens pv garcae*, o maior rendimento foi do acesso LA-132. A caracterização química por CG-EM, mostrou o quimiotipo presente em cada óleo essencial e sua quantidade. Isso permitiu classificar, a classe de cada acesso e relacionar com sua atividade sobre os patógenos avaliados, conforme Tabela 10.

Tabela 10. Rendimento e Classe Química dos acessos avaliados.

Acesso	Rendimento (%)	Quimiotipo	%	Classe Química
LA-42	0,89	Linalol	67,57	Monoterpeno oxigenado
LA-108	1,43	Cítral	41,51	Monoterpeno oxigenado
LA-129	0,35	Mirceno	40,75	Monoterpeno hidrocarboneto
LA-132	1,36	Cítral/Mirceno	48,51	Monoterpeno oxigenado/hidrocarboneto

Legenda: Rendimento (%): massa de óleo essencial obtida em relação à massa seca do material vegetal. Quimiotipo: composto presente em maior abundância relativa no óleo essencial. (%): porcentagem relativa determinada por CG-EM. Classe química: grupo químico ao qual pertence o composto majoritário.

5.2 Ensaios com *Hemileia vastatrix*

5.2.1 *In vitro*

Os esporos de *Hemileia vastatrix* expostos ao meio de cultura sem tratamento desenvolveram tubos germinativos, indicando que permaneceram viáveis. Em contraste, os esporos expostos aos óleos essenciais extraídos de *Lippia alba*, em todas as concentrações avaliadas, não desenvolveram tubos germinativos, resultando em 100% de inibição da germinação (Figura 21). Resultado semelhante foi observado para o controle positivo (produto comercial), no qual também não houve formação de tubos germinativos.

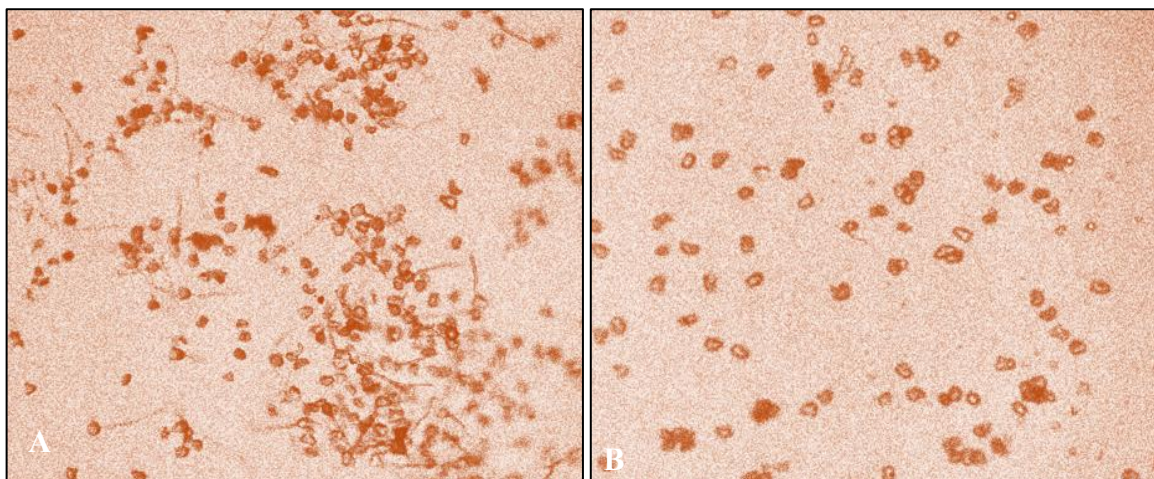


Figura 21. Comparação entre controle negativo e óleo essencial de *Lippia alba* **a.** Germinação dos esporos de *Hemileia vastatrix* **b.** Inibição da germinação dos esporos de *H. vastatrix*.

5.2.2 *In planta*

Nos tratamentos aplicados antes da inoculação (tratamento preventivo) de *Hemileia vastatrix*, foram observados diferentes padrões de resposta. Quando comparados ao controle negativo, a maioria dos tratamentos apresentou aumento da severidade da ferrugem. Para quantificar a magnitude desse efeito, os valores de AACPD foram convertidos em porcentagem de redução da severidade em relação ao controle negativo. Dentre os tratamentos avaliados, apenas o controle positivo e o tratamento LA-129 a 0,05% apresentaram valores positivos de redução da severidade (Figura 22).

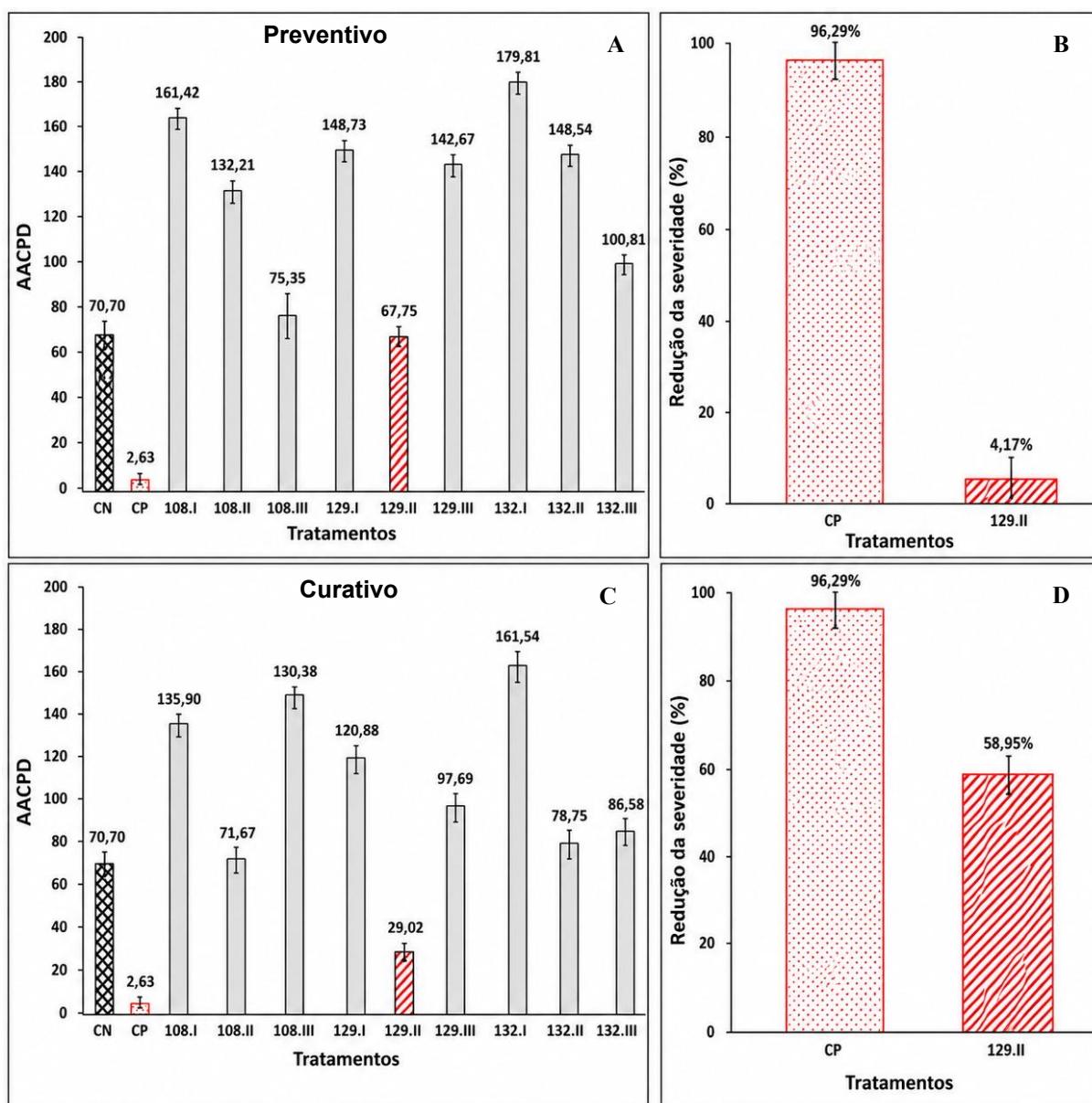


Figura 22. Efeito dos óleos essenciais de *Lippia alba* sobre a severidade da ferrugem do cafeeiro em aplicações preventiva e curativa. Os painéis apresentam os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a aplicação preventiva (A) e curativa (C), bem como a redução da severidade em relação ao controle negativo para a aplicação preventiva (B) e curativa (D). CN: controle negativo, plantas inoculadas sem tratamento; CP: controle positivo, produto comercial. Os tratamentos 108, 129 e 132 correspondem aos diferentes acessos (LA) avaliados nas concentrações I (0,0125%), II (0,05%) e III (0,2%). As barras representam a média dos tratamentos e as barras de erro representam o erro padrão da média.

Nos tratamentos aplicados após a inoculação (tratamento curativo) de *Hemileia vastatrix*, foram observados diferentes padrões de resposta. Quando comparados ao controle negativo, a maioria dos tratamentos apresentou aumento da severidade da ferrugem, enquanto o tratamento LA-129 a 0,05% foi o único a promover redução da severidade da doença. Os resultados de redução da severidade (%) foram os mesmos tratamentos.

5.3 Ensaaios com *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*

5.3.1 *In vitro*

Os óleos essenciais extraídos dos acessos LA-42 (quimiotipo linalol) e LA-132 (quimiotipo citral/mirceno) apresentaram elevada atividade antibacteriana contra *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, evidenciada pelos efeitos bacteriostático e bactericida observados nas mesmas concentrações mínimas de 0,25 e 0,5 mg/mL. Esses resultados indicam forte potencial antimicrobiano dos dois acessos, uma vez que foram capazes de inibir o crescimento bacteriano e promover a eliminação do patógeno em baixas concentrações. Com base nesse desempenho *in vitro*, os acessos foram selecionados para avaliação em mudas jovens de *Coffea arabica*, com o objetivo de verificar se a atividade observada em condições controladas seria mantida em condições *in planta*.

5.3.2 *In planta*

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre o progresso da mancha aureolada ao longo do período experimental, foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), que representa a severidade acumulada da doença durante as avaliações. Adicionalmente, os valores de AACPD foram convertidos em porcentagem de redução da severidade em relação ao controle negativo (CN), permitindo quantificar a eficácia dos tratamentos. Tanto as aplicações realizadas antes da inoculação de *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* (tratamento preventivo) quanto aquelas realizadas após a inoculação (tratamento curativo) apresentaram padrão de resposta semelhante. Entretanto, os tratamentos preventivos mostraram desempenho ligeiramente superior aos curativos.

De modo geral, todos os tratamentos contendo óleos essenciais apresentaram valores de AACPD inferiores aos observados no controle negativo, indicando redução do progresso da doença. No entanto, a magnitude dessa redução foi relativamente próxima entre os tratamentos avaliados. O maior efeito foi observado para o tratamento LA-132.I (0,025%), que promoveu redução de 31,34% da severidade na aplicação preventiva, superando inclusive o controle positivo, cuja redução foi de apenas 8,39%. Por outro lado, o controle positivo apresentou baixa eficiência na redução da severidade da doença nas condições deste experimento (Figura 23).

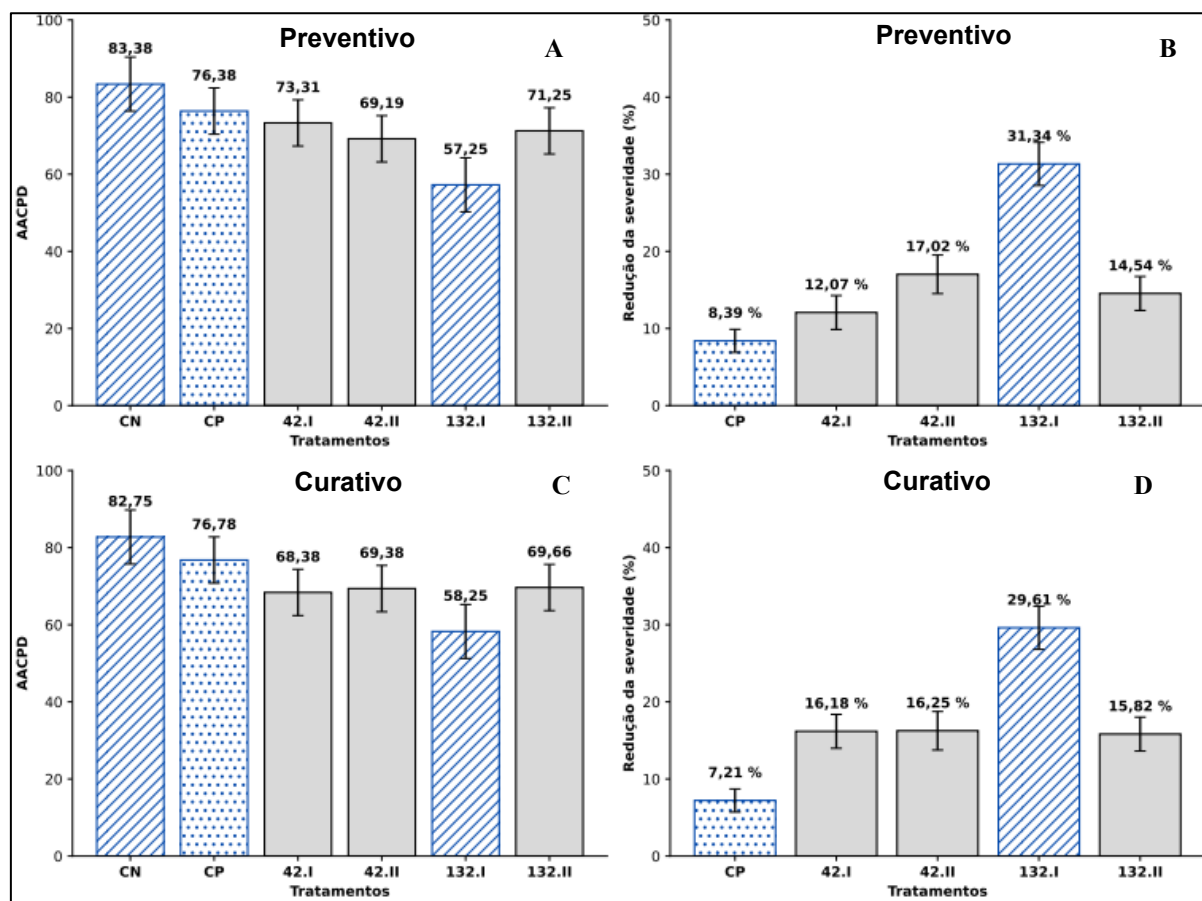


Figura 23. Efeito dos óleos essenciais de *Lippia alba* sobre a severidade da mancha aureolada em aplicações preventiva e curativa. Os painéis apresentam os valores de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a aplicação preventiva (A) e curativa (C), bem como a redução da severidade em relação ao controle negativo para a aplicação preventiva (B) e curativa (D). CN: controle negativo, plantas inoculadas sem tratamento; CP: controle positivo, produto comercial. Os tratamentos 42 e 132 correspondem aos diferentes acessos (LA) avaliados nas concentrações I (0,025%), II (0,05%). As barras representam a média dos tratamentos e as barras de erro representam o erro padrão da média.

A análise de componentes principais (PCA) explicou 94,3% da variabilidade total dos dados. O controle não inoculado (MOK) apresentou clara separação dos demais tratamentos, enquanto os controles positivos (CP) e negativo (CN) permaneceram agrupados na região associada às variáveis de severidade. Embora não tenha sido observada separação evidente entre os quimiotipos linalol (LA-42) e citral/mirceno (LA-132), o tratamento LA-132 a 0,025% posicionou-se mais próximo ao MOK, sugerindo menor progressão da doença e comportamento mais semelhante ao das plantas sadias. Por outro lado, os tratamentos preventivos e curativos apresentaram ampla sobreposição, indicando que a forma de aplicação não constituiu a principal fonte de variação dos dados (Figura 24).

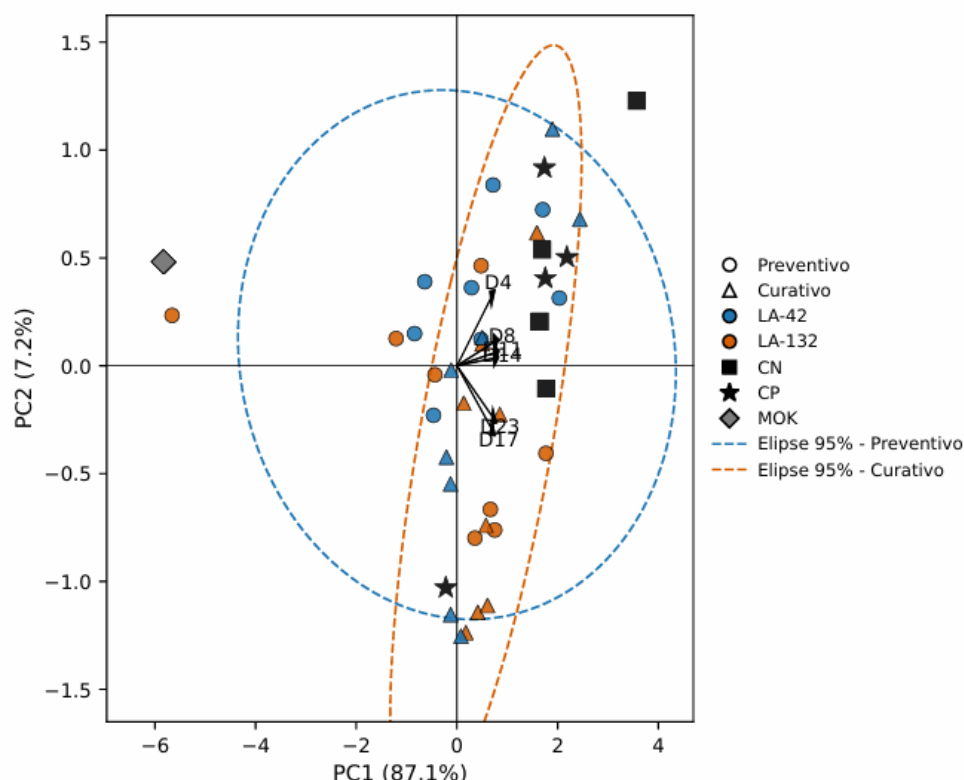


Figura 24. Análise de componentes principais (PCA) baseada nas avaliações de severidade da mancha aureolada do cafeeiro nos dias 4, 8, 11, 14, 17 e 23 após a inoculação. O gráfico explica 94,3% da variabilidade total dos dados, sendo 87,1% representados pelo PC1 e 7,2% pelo PC2. Os pontos representam os tratamentos com os óleos essenciais dos quimiotipos linalol (LA-42) e citral/mirceno (LA-132) aplicados de forma preventiva ou curativa. CN = controle negativo; CP = controle positivo; MOK = controle não inoculado. As elipses representam os intervalos de confiança de 95% para os grupos preventivo e curativo. Os vetores indicam a contribuição das avaliações de severidade para a formação dos componentes principais.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, demonstraram que os óleos essenciais extraídos de *Lippia alba* quando aplicados nas folhas de café, apresentam atividade fungistática contra *Hemileia vastatrix* e bacteriostática contra *Pseudomonas bacteriostática coronafaciens* pv. *garcae*. Entre os quimiotipos avaliados, apenas mirceno (acesso LA-129) e citral/mirceno (acesso LA-132) apresentaram redução da severidade das doenças, enquanto os quimiotipos ricos em linalol (acesso LA-42) e citral (acesso LA-108) não promoveram controle significativo nas condições avaliadas.

Połec et al. (2020) demonstraram que o monoterpene mirceno é capaz de alterar propriedades físico-químicas de membranas biológicas, enquanto Albayrak et al. (2023)

observaram alterações morfológicas e celulares em fungos fitopatogênicos expostos ao composto. Além disso, Cruz et al. (2022) relataram atividade antimicrobiana de um óleo essencial contendo elevada proporção de mirceno, indicando que compostos ricos nesse constituinte podem apresentar atividade biológica relevante. Embora a atividade antimicrobiana para esse monoterpene seja comprovada, poucos estudos avaliaram diretamente sua relação com o controle de *Hemileia vastatrix* e *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*. Dessa forma, os resultados obtidos ampliam as evidências disponíveis ao indicar que quimiotipos contendo mirceno podem apresentar maior potencial biológico do que quimiotipos contendo linalol ou citral nas condições avaliadas.

Embora os quimiotipos linalol e citral apresentem reconhecida atividade antimicrobiana, sua eficiência depende do microrganismo-alvo, da concentração utilizada e das condições de aplicação. No caso do linalol, a ausência de controle observada contra *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* é compatível com os resultados de Liu et al. (2020) e Guo et al. (2021), que relataram concentrações inibitórias e bactericidas relativamente elevadas para espécies de *Pseudomonas*. O linalol é frequentemente descrito como um composto capaz de alterar a permeabilidade das membranas celulares e promover extravasamento de constituintes intracelulares (Bakkali et al., 2008; Nazzaro et al., 2013).

De forma semelhante, o desempenho limitado do quimiotipo rico em citral reforçam estudos que apontam a elevada volatilidade e a baixa persistência desse aldeído monoterpênico após a aplicação foliar (Ay et al., 2019; Dai et al., 2023; Liao et al., 2023). Morales-Aranibar et al. (2023) também demonstraram que formulações ricas em citral geralmente requerem concentrações superiores para promover reduções consistentes da ferrugem-do-cafeeiro, o que está de acordo com a ausência de controle observada neste estudo, apesar da completa inibição da germinação dos esporos em condições *in vitro*.

Os ensaios *in vitro* demonstraram elevada atividade antimicrobiana e antifúngica, enquanto os experimentos *in planta* apresentaram controle parcial ou inexistente para a maioria dos tratamentos com óleos essenciais. Essa discrepância entre a atividade observada em condições laboratoriais e o desempenho em plantas já foi relatada por diferentes autores. Pereira et al. (2012), ao avaliarem óleos essenciais contra a ferrugem do cafeeiro, observaram inibição da germinação de esporos acompanhada apenas de redução parcial da severidade da doença. De forma semelhante, Gañán-Betancur et al. (2024) verificaram que óleos essenciais de tomilho e melaleuca apresentavam atividade antifúngica expressiva *in vitro*, mas baixa eficiência em folhas destacadas e plantas envasadas. Resultados semelhantes também foram descritos por

Amini et al. (2016), que destacaram que fatores ambientais, fisiológicos e físico-químicos podem alterar significativamente a disponibilidade dos compostos após a aplicação, limitando sua eficácia em condições reais.

Além disso, observou-se influência do momento de aplicação, com tendência de melhor desempenho dos tratamentos curativos para a ferrugem e dos tratamentos preventivos para a mancha-aureolada. O comportamento observado em relação ao momento de aplicação também concorda com estudos anteriores. Para *Hemileia vastatrix*, a tendência de melhor desempenho dos tratamentos curativos está de acordo com trabalhos que associam a eficiência dos óleos essenciais à inibição da germinação dos esporos e à interferência em etapas iniciais do processo infeccioso (Pereira et al., 2012). Para *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, por outro lado, a tendência de melhor desempenho dos tratamentos preventivos é compatível com a rápida colonização da superfície foliar descrita para espécies do gênero *Pseudomonas* (Yang et al., 2023). Resultados semelhantes foram relatados por Nunes da Silva et al. (2025), que observaram maior eficiência de determinados óleos essenciais quando aplicados previamente à inoculação bacteriana.

Outro resultado que se destacou neste estudo, foi o aumento da severidade da ferrugem observado na menor concentração avaliada (0,0125%), independentemente do óleo essencial utilizado. Esse comportamento não é normalmente relatado em estudos que avaliam óleos essenciais como agentes de controle de fitopatógenos, os quais geralmente descrevem redução progressiva da atividade biológica em função da diminuição da concentração, mas não aumento da severidade da doença. Esse resultado sugere que concentrações subletais podem desencadear efeitos indiretos que vão além da ação antimicrobiana direta dos compostos avaliados. Estudos recentes demonstram que terpenoides e outros compostos voláteis participam ativamente da estruturação das comunidades microbianas associadas à filosfera (De Mandal e Jeon, 2023; Ishizaki et al., 2025; Zhang et al., 2024). Rosalie et al. (2018) também demonstraram que o linalol é capaz de modular comunidades bacterianas associadas às plantas de maneira dependente da concentração. Embora essa hipótese não tenha sido avaliada diretamente neste trabalho, os resultados observados são consistentes com o conhecimento atual sobre a influência dos metabólitos secundários vegetais na organização da microbiota foliar.

Em conjunto, esses resultados evidenciam que a atividade de compostos isolados como antimicrobianos nem sempre se traduz em eficiência agronômica. Além disso, reforçam a importância de considerar fatores como concentração, persistência dos compostos, composição

química completa dos óleos essenciais e interação com o ambiente biológico ao interpretar os resultados obtidos em plantas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho confirmam a hipótese de que os óleos essenciais de *Lippia alba* apresentam efeito sobre *Hemileia vastatrix* e *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae*, sendo a resposta dependente do quimiotipo, da concentração utilizada e da forma de aplicação. Observou-se que patógenos com características biológicas distintas respondem de maneira diferente aos óleos essenciais extraídos. Entre os quimiotipos avaliados, o citral/mirceno (acesso LA-132) apresentou maior potencial para o manejo preventivo da mancha-aureolada, enquanto o quimiotipo mirceno (acesso LA-129), na concentração de 0,05% e aplicação curativa, destacou-se no controle da ferrugem do cafeeiro, sendo o único tratamento capaz de reduzir a severidade da doença em comparação ao controle negativo.

Dessa forma, conclui-se que os óleos essenciais de *Lippia alba* apresentam potencial como bioinsumos, sendo utilizados como ferramentas complementares no manejo integrado de doenças do cafeeiro. Os objetivos propostos foram alcançados ao identificar quimiotipos promissores, avaliar o efeito da concentração e da forma de aplicação e comparar a resposta dos patógenos em condições *in vitro* e *in planta*. No entanto, seu uso prático depende do entendimento do ciclo biológico do patógeno e do ajuste adequado do quimiotipo, da dose e do momento de aplicação, sendo necessários estudos adicionais para consolidar sua aplicação em condições de campo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H. F. A. et al. Activity of essential oils and plant extracts as biofungicides for suppression of soil-borne fungi associated with root rot and wilt of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Horticulturae**, v. 9, n. 2, p. 222, 2023.
- ALBAYRAK, G. et al. Investigation of antifungal activities of myrcene on *Fusarium* reference strains. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 3, p. 82, 2023.

ALLIZOND, V. et al. *In vitro* antifungal activity of selected essential oils against drug-resistant clinical *Aspergillus* spp. strains. **Molecules**, v. 28, n. 21, p. 7259, 2023.

ANGANE, H. B. et al. Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 464, 2022.

AVELINO, J. et al. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. **Food Security**, v. 7, n. 2, p. 303–321, 2015.

BARBOSA, M.F. et al. Biological resources driving productivity: bioinputs for sustainable plant agriculture in Brazil. **Sustainable Microbiology**, v. 2025, n. 3, p. 11, [s.d.].

BECK, H. E. et al. Present and Future Köppen-Geiger Climate Classification Maps at 1-km Resolution. **Scientific Data**, v. 5, n. 5, p. 180214, 30 out. 2018.

BECKMAN, J.; IVANIC, M.; JELLIFFE, J. Market impacts of Farm to Fork: Reducing agricultural input usage. **Applied Economic Perspectives and Policy**, 8 jul. 2021.

BEKELE, K. B. Global importance of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) on coffee industry and its management options. **Research & Development**, v. 3, n. 3, p. 159–167, 2022.

BLANK, A. F. et al. Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. e321924, 14 maio 2015.

BORGES, D. F. et al. Nematicidal potential of essential oils of *Ageratum fastigiatum*, *Callistemon viminalis* and *Schinus terebinthifolius*. **Bioscience Journal**, p. 90–96, 1 jan. 2018.

BORROMEO, I.; GIORDANI, C.; FORNI, C. The Role of Plant-Derived Essential Oils in Eco-Friendly Crop Protection Strategies Under Drought and Salt Stress. **Plants**, v. 14, n. 24, p. 3789, 12 dez. 2025.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 27 maio 2020.

ROSALIE et al. Bacteria colonising *Penstemon digitalis* show volatile and tissue-specific responses to a natural concentration range of the floral volatile linalool. v. 28, n. 1, p. 11–19, 1 mar. 2018.

APARECIDA CRISTIANO CABRAL, S. et al. Management of coffee leaf rust using L-glutamic acid biofertilizer combined with fungicide. **Coffee Science**, v. 17, p. 1–8, 2022.

CAETANO, A. R. S. et al. Antifungal activity of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles incorporated with *Eucalyptus* essential oils against *Hemileia vastatrix*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1028–1041, 1 out. 2022.

CALIXTO, C. C. A. et al. Mancha aureolada do cafeeiro: cenário atual e inovações no controle da doença. In: **INIC – Congresso de Iniciação Científica da Univap**, 2025, São José dos Campos. Anais [...]. São José dos Campos: Univap, 2025.

CAMILLO, Flávia Cunha. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, p. 21–27, 23 maio 2017.

CARDOSO, P. H. et al. *Verbenaceae* in Espírito Santo, Brazil: richness, patterns of geographic distribution and conservation. **Phytotaxa**, v. 484, n. 1, 2021.

CBI. **What requirements must coffee comply with to be allowed on the European market?** | CBI. Disponível em: <<https://www.cbi.eu/market-information/coffee/what-requirements-should-your-product-comply>>.

CHAUHAN, N. et al. Major determinants of sustainable agriculture practices adoption: A systematic review. **Land Use Policy**, v. 164, p. 107941, 2026.

CHENG, R. et al. Advances in the Biosynthesis of Plant Terpenoids: Models, Mechanisms, and Applications. **Plants**, v. 14, n. 10, p. 1428–1428, 2025.

CHRISTOVA, P. K. et al. The Impact of Plant Essential Oils on the Growth of the Pathogens *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, and *Phytophthora pseudocryptogea*. **Life**, v. 14, n. 7, p. 817, 2024.

Coffea arabica. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Coffea_arabica>.

CRUZ, R. P. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Essential Oil of *Acritopappus confertus* (Gardner) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae). **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, p. 1275–1275, 2022.

DAI, J. et al. Antibacterial properties of citral against *Staphylococcus aureus*: From membrane damage to metabolic inhibition. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102770, 2023.

DE CLERCK, C. et al. Use of Essential Oils and Volatile Compounds as Biological Control Agents. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 1062, 2021.

DE MANDAL, S.; JEON, J. Phyllosphere Microbiome in Plant Health and Disease. **Plants**, v. 12, n. 19, p. 3481, 2023.

DHIFI, W. et al. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DUNAN, L. et al. Effects of essential oil-based formulation on biopesticide activity. **Industrial Crops and Products**, v. 202, p. 117006–117006, 2023.

EUROPEAN COMMISSION. **Farm to Fork Strategy**. Disponível em: <https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>.

CUNHA CAMILLO, F. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, p. 21–27, 2017.

FERREIRA, P. et al. Impacts of Brazilian Green Coffee Production and Its Logistical Corridors on the International Coffee Market. **Logistics**, v. 8, n. 2, p. 39–39, 9 abr. 2024.

FREITAS, M.L.O. 2017. Epidemiologia e controle da mancha-aureolada do cafeeiro. **Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)**. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GAÑÁN-BETANCUR, L. et al. Essential Oils for Managing Anthracnose in Mango (*Mangifera indica*): Laboratory Results Do Not Translate into Field Efficacy. **Plant Disease**, v. 108, n. 10, p. 3033–3043, 2024.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408–414, 2007.

GOSALVITR, P. et al. An environmental and economic sustainability assessment of coffee production in the UK. **Chemical Engineering Journal**, v. 465, p. 142793, 2023.

GOSTIN, I. N.; BLIDAR, C. F. Glandular Trichomes and Essential Oils Variability in Species of the Genus *Phlomis* L.: A Review. **Plants**, v. 13, n. 10, p. 1338, 2024.

GUELIFET, K. et al. Seasonal and Extraction-Dependent Variation in the Composition and Bioactivity of Essential Oils from Wild *Rosmarinus officinalis* L. **Molecules**, v. 30, n. 21, p. 4258, 2025.

- JULCA-OTINIANO, A. et al. New Races of *Hemileia vastatrix* Detected in Peruvian Coffee Fields. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1811–1811, 2024.
- KATIRAE, F. et al. In vitro antifungal activity of essential oils extracted from plants against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans*. **Current Medical Mycology**, v. 3, n. 2, p. 1–6, 2017.
- ATHINA KOUTOULEAS. Coffee Leaf Rust: Wreaking Havoc in Coffee Production Areas Across the Tropics. **Plant Health Cases**, 2023.
- LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 2, p. 259–266, 1999.
- LI, X. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2023.
- LI, Y. et al. Antibacterial Mechanism of Linalool against *Pseudomonas fragi*: A Transcriptomic Study. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2058, 2022.
- LIAO, Z. et al. Transcriptomic analyses reveal the potential antibacterial mechanism of citral against *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
- MALIK, S. et al. New insights into the biotechnology and therapeutic potential of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 6, p. 523–535, 2021.
- MOHAMMED, H. A. et al. Aromatic Volatile Compounds of Essential Oils: Distribution, Chemical Perspective, Biological Activity, and Clinical Applications. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 9, 2025.
- MORRIS, C. E. et al. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. **The ISME Journal**, v. 2, n. 3, p. 321–334, 2008.
- NASCIMENTO, V.S.A. 2016. Sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *Lippia gracilis*: obtenção, caracterização e potencial ação amebicida. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.
- SILVA, N.M. et al. Antimicrobial Potential of Six Plant Essential Oils Against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae: *In Vitro* Activity and In Planta Efficacy Do Not Always Align. **Plants**, v. 14, n. 24, p. 3825, 2025.

OLIVEIRA, A. R. M. F. DE et al. LEAF ANATOMY AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION IN NATIVE SPECIES OF LIPPIA. **BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE - Revista de Agricultura**, v. 93, n. 3, p. 324, 2019.

OLIVEIRA, M.J. et al. Effect of temperature and photoperiod on *Pseudomonas syringae* pv. garcae inoculum production. **Coffee Science**, v. 19, p. 1–9, 2024.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). 2023. Integrated pest management (IPM). Roma.

PEDROSO, M. B. et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against *Botrytis cinerea*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 48, 2024.

PEIXOTO, M. G. et al. In vitro conservation and leaf anatomy of different chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 1, p. 41–51, 2017.

PENG, D. et al. Phyllosphere bacterial community dynamics in response to bacterial wildfire disease: succession and interaction patterns. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 2024.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; ALVES, E. Essential oils for rust control on coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 383–390, 2012.

POŁEĆ, K. et al. The impact of β -myrcene – the main component of the hop essential oil – on the lipid films. *Journal of Molecular Liquids*, v. 308, p. 113028, 2020.

PORFÍRIO, E. M. et al. *In Vitro* Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. **TheScientificWorldJournal**, v. 2017, p. 4962707, 2017.

BARBOSA, M. F. et al. Biological resources driving productivity: bioinputs for sustainable plant agriculture in Brazil. **Sustainable Microbiology**, v. 2025, n. 3, p. 11, 2025.

RAMÍREZ-CAMEJO, L. A. et al. Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) from the Recent Invasion into Hawaii Shares a Genotypic Relationship with Latin American Populations. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 189, 2022.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 365, 21 mar. 2020.

REBOUÇAS, N.P.B.; FERREIRA, D.L. ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BR. (VERBENACEAE) NO MUNICÍPIO DE ITACOATIARA, AMAZONAS. **Biodiversidade**, v. 23, n. 03, 2024.

RODRIGUES, M.; MAZZAFERA, P. Essential oils from *Eucalyptus* species: a review of their activities, applications, and the Brazilian market. **Acta Botanica Brasilica**, v. 39, p. e20240111, 2025.

SALEEM, M. et al. Microbial Interactions in the Phyllosphere Increase Plant Performance under Herbivore Biotic Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

SANTOS, C. S. et al. Assessment of leaf anatomic and physiological characteristics and genetic divergence among *Coffea arabica* L. cultivars in the Brazilian Savanna. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 52, e73265, 2022.

SANTOS, M.E.A.H.P. Caracterização de variabilidade genética, óleos essenciais e suas atividades antimicrobianas em germoplasma de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. **Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)** Instituto Agrônomo, Campinas, 2022.

ARVIND SAROJ et al. Antifungal action of *Lippia alba* essential oil in *Rhizoctonia solani* disease management. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 10, 2019.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004.

SESSO, P.P.; SESSO FILHO, H.A.; PEREIRA, L.F.P. 2021. Dimensionamento do agronegócio do café no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 38, n. 2, e26901, 2021.

SERA, G. H. et al. Production and trade of specialty coffee in Brazil. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 42403–42403, 2025.

SIA, R. et al. Sustainability Assessment of the *Arabica Coffee* Agribusiness in North Toraja: Insight from a Multidimensional Approach. **Sustainability**, v. 17, n. 5, p. 2167, 2025.

SOUSA, D. P. et al. Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

STENGER, L. D. et al. Óleos essenciais na indução de resistência a patógenos em *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciencia rural**, v. 51, n. 9, p. 7, 2021.

TALHINHAS, P. et al. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* : one and a half centuries around the tropics. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1039–1051, 2017.

TARAZONA-PULIDO, L. et al. Approach of Genetic Diversity of *Lippia alba* (Mill) and *Petiveria alliacea* L.: Medicinal Plants of Colombia. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 43, n. 2, p. 602–616, 2024.

TONIUTTI, L. et al. Influence of Environmental Conditions and Genetic Background of *Arabica Coffee* (*C. arabica* L) on Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) Pathogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

WANG, L. et al. Linalool as a potential agent for inhibiting *Escherichia coli* biofilm formation and exopolysaccharide production. **BMC Veterinary Research**, v. 21, n. 1, 2025.

WORLD FLORA ONLINE. 2025. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000228665>

YANG, P. et al. Detection, Diagnosis, and Preventive Management of the Bacterial Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plants**, v. 12, n. 9, p. 1765, 2023.

ZHANG, H. et al. Divergence of Phyllosphere Microbial Community Assemblies and Components of Volatile Organic Compounds between the Invasive *Sphagneticola trilobata*, the Native *Sphagneticola calendulacea* and Their Hybrids, and Its Implications for Invasiveness. **Genes**, v. 15, n. 7, p. 955, 20 jul. 2024.

ZIEDAN, E.-S.H.E et al. Evaluation of essential oils nanoemulsions formulations on *Botrytis cinerea* growth, pathology and grey mould incidence on cucumber fruits. **Bulletin of the National Research Centre/Bulletin of the National Research Center**, v. 46, n. 1, 2022.