



FELIPE DOUGLAS SOARES LEAL

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NO CONTROLE DA
FERRUGEM DO CAFEIEIRO**

**LAVRAS - MG
2020**

FELIPE DOUGLAS SOARES LEAL

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NO CONTROLE DA FERRUGEM DO
CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza
Orientador

Dr. Helon Santos Neto
Coorientador

**LAVRAS - MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Leal, Felipe Douglas Soares.

Nanopartículas metálicas no controle da ferrugem do cafeeiro /
Felipe Douglas Soares Leal. - 2020.

72 p.: il.

Orientador (a): Edson Ampélio Pozza.

Coorientador (a): Helon Santos Neto.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. *Hemileia vastatrix*. 3. Doenças de
plantas. I. Pozza, Edson Ampélio. II. Neto, Helon Santos. III.
Título.

FELIPE DOUGLAS SOARES LEAL

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NO CONTROLE DA FERRUGEM DO
CAFEIEIRO**

METALLIC NANOPARTICLES IN COFFEE RUST CONTROL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 06 de Outubro de 2020.
Dra. Deila Magna Santos Botelho - UFLA
Dr. Hudson Teixeira - EPAMIG
Dr. Rodrigo Luz da Cunha – EPAMIG
Prof. Dr. Rubens José Guimarães - UFLA

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza
Orientador

Dr. Helon Santos Neto
Coorientador

**LAVRAS – MG
2020**

A minha mãe Edvania por todo o incentivo, ensinamento, amor, carinho e esforços dedicados à realização dos meus objetivos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por todo amparo e por me fortalecer nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais, meu irmão e a toda minha família, por todo apoio e incentivo.

À minha namorada Indiara, por todo carinho e apoio incondicional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade da realização deste curso de Pós-Graduação e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza, por toda orientação, amizade, respeito, paciência e confiança, prestados durante o desenvolvimento deste trabalho e de todo o curso.

Ao meu coorientador Dr. Helon Santos Neto, por toda atenção, disponibilidade, orientação, incentivo e sugestões no decorrer dessa dissertação.

Às amigas feitas no Departamento de Fitopatologia (DFP),

À Ariane e a Zenóbia por me auxiliarem sempre que precisei, sem medir esforços.

Ao Silvio Calazans, por toda dedicação no Laboratório de Epidemiologia e auxílio nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas, Andreane, Júlio, Nayane, Vitória, Viviane, Júlia, Renata e Mário.

Ao Brunão e o Pedrinho, por toda ajuda nas pulverizações no campo e o transplante das mudas.

Aos membros do Núcleo de Estudos em Fitopatologia – NEFIT.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

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

Muito Obrigado!

ATÉ AQUI NOS AJUDOU O SENHOR.

1 SAMUEL 7:12.

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência de baixas concentrações (≤ 500 mg.L⁻¹) de nanopartículas de prata (NPAg) e de cobre (NPCu) no controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br). Portanto, cinco experimentos foram conduzidos: um *in vitro*, três em casa de vegetação e um em condições de campo. No experimento *in vitro* avaliou-se o efeito dos tratamentos na germinação de uredosporos de *H. vastatrix*. Esse foi realizado em DIC em esquema fatorial 2 x 5 + 1 e oito repetições. As nanopartículas de Ag e Cu constituíram o fator A e as concentrações (0, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) o fator B, também foi utilizado o fungicida (epoxiconazol + piraclostrobina) como tratamento adicional. Em casa de vegetação dois experimentos foram realizados em DBC para determinar a eficiência das nanopartículas, um com a NPAg e outro com a NPCu, ambos nas doses de 0, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹. No 3º experimento em DBC, comparou-se o efeito da NPCu 250 mg.L⁻¹ em relação a outras fontes de cobre (óxido cuproso, hidróxido de cobre e quelato de cobre com EDTA (Cu EDTA)). O experimento em campo foi realizado em DBC, com quatro repetições e sete tratamentos (T1: testemunha sem aplicação; T2: fungicida; T3: NPs Cu + Zn + B + Mn; T4: NPs Cu + Zn + B + Mn + *B. subtilis*; T5: NPs Cu + B + Fungicida; T6: NPs Cu + B + Fungicida + *B. subtilis*; T7: Fungicida + ácido bórico + Cu EDTA), foram avaliadas as variáveis incidência da ferrugem e enfolhamento das plantas mensalmente, entre dezembro de 2019 e maio de 2020. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e quando significativos, as variáveis qualitativas foram comparadas por Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ou por contraste ortogonal com o tratamento adicional. Para as quantitativas foi realizado o ajuste de modelos lineares e não lineares, por análise de regressão. No experimento *in vitro*, a dose de 400 mg.L⁻¹ da NPAg inibiu completamente a germinação dos esporos de *H. vastatrix*. Para a NPCu a máxima inibição foi de 85% na dose de 400 mg.L⁻¹. Em casa de vegetação no experimento com cinco doses de NPCu, a maior redução da AACPS foi observada com a dose de 400 mg.L⁻¹ (97,5%). Para o experimento com a NPAg o comportamento foi semelhante e a redução da AACPS foi maior na dose de 400 mg.L⁻¹, cerca de 92%. No terceiro experimento em casa de vegetação, a NPCu 250 mg.L⁻¹ e o óxido cuproso foram iguais ($p < 0,05$), esses promoveram 84,2% e 83,1% de redução da AACPS, respectivamente. No experimento no campo, o Fungicida reduziu aproximadamente 60% da AACPI. Já as NPs de Cu e B quando aplicadas misturadas com o Fungicida foram eficientes e não diferiram do tratamento onde o Fungicida (T2) foi aplicado isoladamente. Portanto, as nanopartículas surgem como alternativa a ser inserida nas estratégias de manejo integrado da doença.

Palavras-chave: Nanotecnologia. *Hemileia vastatrix*. Manejo. Cobre. Prata. Doenças de plantas.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the efficiency of low concentrations (≤ 500 mg.L⁻¹) of silver (NPAg) and copper (NPCu) nanoparticles in the control of coffee rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br). Therefore, five experiments were conducted: one *in vitro*, three in a greenhouse and one in the field. In the *in vitro* experiment, the effect of treatments on the germination of *H. vastatrix* uredospores was evaluated. This was performed in DIC in a factorial design 2 x 5 + 1 and four repetitions. The nanoparticles of Ag and Cu constituted Factor A and the concentrations (0, 50, 100, 200 and 400 mg.L⁻¹) Factor B, the fungicide (epoxiconazole + pyraclostrobin) was also used as an additional treatment. In greenhouse two experiments were carried out in DBC to determine the efficiency of the nanoparticles, one with NPAg and the other with NPCu, both at doses of 0, 50, 100, 200 and 400 mg.L⁻¹. In the third experiment, the effect of NPCu 250 mg.L⁻¹ was compared to other sources of copper (cuprous oxide, copper hydroxide and copper chelate with EDTA (Cu EDTA)). The field experiment was carried out in DBC, with four replications and seven treatments (T1: control without application; T2: fungicide; T3: NPs Cu + Zn + B + Mn; T4: NPs Cu + Zn + B + Mn + *B. subtilis*; T5: NPs Cu + B + Fungicide; T6: NPs Cu + B + Fungicide + *B. subtilis*; T7: Fungicide + boric acid + Cu EDTA), the variables incidence of rust and plant leafing were evaluated monthly, between December 2019 and May 2020. Data were subjected to analysis of variance ($p \leq 0.05$) and when significant, qualitative variables were compared using the Scott-Knott test ($p < 0.05$) or by orthogonal contrast with the additional treatment. For the quantitative, the adjustment of linear and non-linear models was carried out by regression analysis. In the *in vitro* experiment, the dose of 400 mg.L⁻¹ of NPAg completely inhibited the germination of *H. vastatrix* spores. For NPCu the maximum inhibition was 85% at a dose of 400 mg.L⁻¹. In the greenhouse in the experiment with five doses of NPCu, the greatest reduction in AACPS was observed in the dose of 400 mg.L⁻¹ (97.5%). For the experiment with NPAg, the behavior was similar and the greatest reduction in AACPS occurred in the dose of 400 mg.L⁻¹, about 92%. In the third greenhouse experiment, NPCu 250 mg.L⁻¹ and cuprous oxide were the same ($p < 0.05$), which promoted 84.2% and 83.1% reduction in AACPS, respectively. In the field experiment, Fungicide reduced approximately 60% of AACPI. The Cu and B nanoparticles when applied mixed with the Fungicide were efficient and did not differ from the treatment where the Fungicide (T2) was applied alone. Therefore, nanoparticles appear as an alternative to be included in integrated disease management strategies.

Keywords: Nanotechnology. *Hemilea vastatrix*. Management. Copper. Silver. Plant diseases.

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	11
<u>2 REFERENCIAL TEÓRICO</u>	14
<u>2.1 O cafeeiro e a ferrugem</u>	14
<u>2.2 Cobre</u>	16
<u>2.2.1 Cenário atual</u>	18
<u>3 NANOTECNOLOGIA</u>	21
<u>3.1 Nanopartículas de prata no controle de doenças de plantas</u>	23
<u>3.3.1 Toxicidade das nanopartículas de prata ao meio ambiente</u>	25
<u>3.2 Nanopartículas de cobre no controle de doenças de plantas</u>	26
<u>4 MATERIAL E MÉTODOS</u>	28
<u>4.1 Áreas Experimentais</u>	28
<u>4.1.1 Obtenção de inóculo e inoculação de <i>H. vastatrix</i></u>	29
<u>4.2 Efeito das nanopartículas de Ag e Cu na germinação de uredosporos de <i>H. vastatrix</i></u>	30
<u>4.2.1 Experimento I</u>	30
<u>4.3 Nanopartículas metálicas no manejo da ferrugem em mudas de cafeeiro</u>	31
<u>4.3.1 Experimentos II, III e IV</u>	31
<u>4.4 Nanopartículas no manejo da ferrugem do cafeeiro em plantas adultas</u>	31
<u>4.4.1 Experimento V</u>	31
<u>5 VARIÁVEIS ANALISADAS</u>	32
<u>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	34
<u>7 RESULTADOS</u>	34
<u>8 DISCUSSÃO</u>	50
<u>9 CONCLUSÕES</u>	56
<u>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	57
<u>REFERÊNCIAS</u>	58
<u>ANEXO A – Tabelas</u>	67

1 INTRODUÇÃO

O café está entre as principais *commodities* produzidas no Brasil, o país é o maior produtor e exportador de café e ocupa a segunda posição em consumo no mundo. O estado de Minas Gerais assume singular importância como o maior produtor de café do país, responsável por mais de 50% da produção nacional. A produção brasileira estimada para a safra de 2020 está estimada entre 57 e 62 milhões de sacas de café de 60 kg (CONAB, 2020). Apesar desse volume, exigências por maiores produções e também qualidade da bebida, são constantes na cafeicultura, em razão do aumento do consumo e da exigência globalizada por cafés de bebida nobre ou ‘gourmet’ e ainda a sustentabilidade ambiental e social. A cada ano, os cafeicultores procuram entender essas exigências, com o aumento das áreas plantadas e o emprego de práticas agrícolas eficientes. Apesar dos números positivos da cafeicultura, alguns fatores podem limitar a produtividade, como o desequilíbrio nutricional, déficit hídrico, veranicos prolongados, geadas, pragas e doenças, por exemplo. Com relação às doenças, essas podem causar perdas significativas na produtividade. Entre elas, destaca-se a ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), em função das maiores perdas. Essa doença contribui para reduzir a produtividade e a qualidade do café, além de aumentar o custo de produção, pois são necessárias pulverizações com fungicidas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Atualmente a doença está presente em todas as regiões cafeeiras, caso não seja devidamente controlada, a ferrugem pode provocar perdas de produtividade de ao menos 59,8% (COLARES, 2018).

Dessa forma, é importante realizar o correto manejo da ferrugem do cafeeiro. Utilizar cultivares com diferentes sistemas de resistência para formar novas lavouras é uma das principais medidas de controle (LEAL et al., 2019). Porém, as lavouras brasileiras são majoritariamente formadas por cultivares suscetíveis à ferrugem, devido a serem resistentes a intempéries climáticas, como chuvas escassas (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012). Como consequência, em lavouras de alta produtividade, superiores em média a 30 sacas por hectares, a frequência das pulverizações com fungicidas é alta, de três a quatro aplicações anuais, dependendo do manejo da cultura. Em virtude da maioria dos fungicidas pertencerem ao mesmo grupo químico, pode ocorrer pressão para seleção de indivíduos resistentes na população de *H. vastatrix*.

Como fungicidas recomendados para a ferrugem estão os protetores e os sistêmicos. Entre os sistêmicos destacam-se as formulações *stroby mix*, de triazóis com estrobilurinas.

Enquanto para os protetores os mais empregados são cúpricos, os primeiros testados e adaptados às condições brasileiras, após surgir a ferrugem no país. Os cúpricos possuem ação multissítio e o seu emprego é uma estratégia para manejar a resistência, por evitar a pressão de seleção de indivíduos resistentes. O cobre é micronutriente essencial às plantas e a sua deficiência pode afetar diversos processos como a fotossíntese, a produção de compostos fenólicos e a lignificação. Esses processos desempenham importante papel no sistema de defesa das plantas a doenças (YRUELA, 2009; BROADLEY et al., 2012)

Diversos produtos à base de cobre são comercializados para controlar doenças de plantas. Esses são formulados com diferentes moléculas e recomendados em doses variadas. As principais moléculas de fungicidas cúpricos, são o sulfato (CuSO_4), o hidróxido ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), o oxiclreto $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ e o óxido cuproso (Cu_2O) (AGROFIT, 2020). Porém, os fungicidas cúpricos são recomendados em altas doses, de 1 a 2 kg de cobre metálico por hectare a cada aplicação, sendo que essas doses correspondem de 2 a 4 kg (1250 a 2500 mg.kg^{-1} de Cu^{2+}/ha) dos produtos com 50% de cobre. Essa quantidade por hectare de um metal de transição, de uso constante na mesma área em culturas perenes por décadas, já é questionada em diversos países (LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018). Sendo assim, a aplicação de menores quantidades pode ser necessária, em consonância as novas legislações e a demanda global da população por cultivos ambientalmente corretos.

Para manter a eficiência de um produto de tamanha importância no manejo da resistência aos fitopatógenos e também na nutrição, o emprego de nanopartículas pode contribuir para aperfeiçoar novas estratégias de manejo de doenças do cafeeiro. O seu uso pode ser medida sustentável no controle de doenças de plantas, pois o principal diferencial da escala nanométrica é a potencialização das propriedades físicas e químicas, resultante da área superficial elevada e maior grau de dispersão com menores quantidades do produto a ser pulverizado. Essas características estão relacionadas ao tamanho da estrutura e possibilitam o uso em concentrações reduzidas com as mesmas ou até melhores propriedades em relação a maiores dimensões (NAVROTSKY, 2000; ABDI, 2010; POMASTOWSKI et al. 2017).

Qualquer partícula na dimensão de 1 a 100 nanômetros (nm) é definida como “nano”. Essas possuem propriedades únicas, não compartilhadas por partículas macroscópicas com a mesma constituição química (ZARBIN, 2007; AUFFAN et al., 2009). O potencial das nanopartículas na supressão de diversos patógenos como *Pythium ultimum*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* (PARK et al., 2006); *Bipolaris sorokiniana* (Jo et al., 2009); *Verticillium* sp. (ELMER; WHITE, 2016); *Fusarium oxysporum*

f. sp. *niveum* (BORGATTA et al., 2018); *Alternaria* spp. e *Aspergillus niger* (HASSAN et al., 2018).

Em relação ao controle das doenças do cafeeiro o futuro é promissor, pois recentemente foram realizados estudos sobre o potencial das nanopartículas no controle da ferrugem e cercosporiose. Pérez (2019) realizou experimento *in vitro* para verificar a germinação de esporos de *H. vastatrix* tratados com nanopartículas de Ag, B, CeO₂, CuO, MnO, MoO₃, NiO, AlO, TiO₂ e ZnO nas doses de 100, 300, 500, 800 e 1000 mg.L⁻¹. As NPs de Ag, Zn, Mo, Ce e Cu reduziram a germinação para menos de 50%, na menor concentração testada de 100 mg.L⁻¹. No entanto, 200 mg.L⁻¹ de Ag e Mo reduziram a germinação de esporos de *H. vastatrix* para menos de 2%. Ao aplicar a NP de Ni, a germinação dos esporos permaneceu estável (77%) até a dose de 300 mg.L⁻¹. A germinação média de esporos no controle foi de 73,2%. Em casa de vegetação o mesmo autor avaliou a eficiência da dose de 500 mg.L⁻¹ dessas nanopartículas para controlar a ferrugem do cafeeiro. A maior supressão da ferrugem em relação ao controle foi observada quando aplicadas as NPs de Ag e Cu (93 e 75%), respectivamente.

Em outro estudo *in vitro*, Carvalho (2019) verificou a influência das nanopartículas de Cu, Ce, Mn, Zn, Ag e B, nas doses de 3, 50, 100, 250 e 500 mg.L⁻¹ sob a germinação de esporos de *Cercospora coffeicola*. As nanopartículas de prata, cério e cobre na dose de 500 mg.L⁻¹ apresentaram redução da germinação de 100%, 99,66%, 98,64% comparadas às testemunhas. As mesmas nanopartículas foram aplicadas na dose de 500 mg.L⁻¹ em mudas de cafeeiro para controlar a cercosporiose e os resultados foram semelhantes aos encontrados *in vitro*. O percentual de controle comparado à testemunha foi de 58%, 31%, 25% e 16% para as nanopartículas de prata, cério, boro e cobre, respectivamente.

Em razão da demanda da sociedade por cafés especiais com maior sustentabilidade financeira, social e ambiental, recentemente diversas pesquisas investigaram medidas alternativas para controlar doenças de plantas, como a utilização de indutores de resistência, fertilizantes foliares e as nanopartículas metálicas (GUIMARÃES et al., 2016; LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência de baixas concentrações (≤ 500 mg.L⁻¹) de nanopartículas de prata (NP_{Ag}) e cobre (NP_{Cu}) na germinação de esporos de *H. vastatrix* e no progresso da ferrugem em mudas de cafeeiro. Além disso, foi comparada a eficiência das nanopartículas de óxido de cobre em relação a outras fontes de cobre.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro e a ferrugem

O café destaca-se no cenário mundial tanto em produção, quanto em consumo. A produção mundial de café passou de 140 milhões de sacas em 2010/11 para aproximadamente 170 milhões no início da safra 2019/20, a uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 3% (ICO, 2019). Ao final da safra 2018/2019 o consumo mundial de café cresceu 4,3% (168,7 milhões de sacas), com expectativa de continuidade em 2019/2020. No entanto, o consumo de café foi de 167,8 milhões de sacas em 2019/2020 com redução de 0,5% em relação à safra anterior, devido à retração global da economia e o limitado consumo de café fora de casa, em razão da pandemia do COVID-19 (ICO, 2020).

A espécie *Coffea arabica* representa mais de 70% da produção total (arábica e conilon) de café e está entre as principais culturas plantadas no Brasil. A área plantada de cafeeiros com *C. arabica* no país, representa 81,3% do total, perfazendo cerca de 1,75 milhão de hectares. Entre os estados brasileiros produtores, Minas Gerais concentra 1,21 milhão de hectares cultivados com *C. arabica*, isso corresponde a 72,1% da área nacional. Com temperaturas amenas e bom volume de chuvas, na maioria das áreas produtoras, as condições climáticas são favoráveis à cafeicultura, garantindo ao estado o destaque de maior produtor de café do país. A produção estimada de *C. arabica* para Minas Gerais na safra de 2020 será entre 30,7 e 32,1 milhões de sacas, correspondendo a um incremento de 25,1% e 30,7%, respectivamente, em relação à safra de 2019. De modo semelhante, para a região Sul do estado de Minas Gerais as estimativas são de crescimento (27,3%) quando comparada à safra de 2019, a produção poderá chegar a 17,8 milhões de sacas (CONAB, 2020). No entanto, toda essa produção pode ser reduzida devido a diversos fatores, como as doenças. Além de afetar a produtividade do cafeeiro, as doenças interferem na qualidade final da bebida (POZZA et al, 2010, DE LIMA et al, 2012).

Entre as doenças do cafeeiro encontra-se a ferrugem, cujo agente etiológico é o fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Historicamente a ferrugem é a doença de maior importância para a cafeicultura, ocorrendo praticamente em todas as regiões produtoras de café do mundo (COUTTOLENC-BRENIS, 2020; YIRGA, 2020; TALHINHAS, 2017; AVELINO, 2015; MCCOOK; VANDERMEEN, 2015; GUICHURU, 2012; NAIR, 2010). O primeiro relato da doença no mundo foi em 1869, no Ceilão, atual Sri Lanka, feito por J.M. Berkeley

(MCCOOK; VANDERMEEN, 2015). Porém no Brasil, a doença foi relatada somente em 1970 no sul do estado da Bahia em *C. arabica* e nos meses seguintes do mesmo ano a ferrugem já era encontrada em todos os estados produtores (ALMEIDA, 1986; WELLMAN, 1970). A ferrugem causa sérios efeitos deletérios no cafeeiro, entre eles a redução da área foliar fotossintetizante, em consequência da formação de lesões, da seca dos ramos laterais e da queda precoce das folhas. Esses efeitos culminam em perdas de produtividade no ano seguinte (FERNANDES et al., 2013; POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Em estudo recente, Colares (2018) utilizou a modelagem matemática para estimar as perdas de produtividade do cafeeiro causadas por ferrugem. Segundo o autor, essas perdas podem variar de 59,8% a 99,8% (COLARES, 2018).

Os sintomas iniciais da ferrugem são pequenas manchas cloróticas localizadas na face inferior das folhas. As manchas aumentam de tamanho e sobre elas surge uma massa amarelada de aspecto pulverulento, formada por uredosporos. Como consequência do progresso da doença, algumas partes do tecido foliar são necrosadas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

O método químico é o mais empregado para controlar a ferrugem do cafeeiro. No entanto, o controle é realizado com base em pulverizações calendarizadas. Sendo assim, fungicidas protetores e/ou sistêmicos são aplicados no período de outubro/dezembro a março/abril, envolvendo quatro a cinco pulverizações a cada 30 dias, no caso de fungicidas protetores. Entre os fungicidas protetores utilizados no Brasil e em outros países da América do Sul, a calda bordalesa, oxiclreto, óxido e hidróxido de cobre são considerados os mais eficientes (ZAMBOLIM, 2016). A fim de evitar a pressão para seleção de populações resistentes de *H. vastatrix*, programas de controle da ferrugem são empregados com base na aplicação de fungicidas cúpricos e da mistura de fungicidas do grupo dos triazóis com estrobilurinas (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

Apesar da eficiência já comprovada dos fungicidas utilizados na cafeicultura, as estratégias de manejo da ferrugem e de outras doenças não devem consistir somente no emprego desses. A manutenção da água e da fertilidade do solo deve fazer parte das estratégias do manejo de doenças (LEAL et al., 2019). Todos os nutrientes essenciais podem afetar a incidência e a intensidade das doenças das plantas (POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015), portanto, a nutrição equilibrada associada ao suprimento de água é uma medida eficaz para promover o aumento da produtividade e reduzir as doenças (DATNOFF; ELMER; HUBER, 2007; POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015; PÉREZ et al., 2019; SILVA et al.,

2019), pois plantas com a nutrição equilibrada possuem maior capacidade de sintetizar barreiras físicas e químicas, dificultando a penetração e colonização de tecidos foliares por patógenos (HUBER; ROMHELD; WEINMANN, 2012). Os micronutrientes desempenham importante papel na constituição de barreiras de defesa das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013), entre eles o ferro, o zinco e o cobre são relacionados tanto à indução de resistência quanto a formação de barreiras (BÉLANGER et al., 2013).

2.2 Cobre

Em 1882 foi inventada a calda bordalesa, o primeiro fungicida à base de cobre (Cu). O seu inventor foi o médico-botânico Pierre Marie-Alexis Millardet, então professor da Universidade de Bordeaux na França, região da qual resultou no nome da calda (CDA, 2003; MIZUBUTI; MAFFIA, 2013; LEAL et al, 2019). Ainda no século XIX, na Nova Zelândia o controle da requeima da batata (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) foi realizado com a aplicação da calda bordalesa. Esse fato levou à comprovação do cobre como micronutriente essencial para o crescimento das plantas, pois o elemento proporcionou incremento no rendimento da batata após a aplicação da calda bordalesa quando não havia a doença no campo (EVANS; SOLBERG; HUBER, 2007). O uso da calda bordalesa como fungicida estimulou o rápido desenvolvimento de outros fungicidas cúpricos. Em virtude disso, houve grandes avanços na agricultura do século XX, em especial na proteção de plantas (PRINTZ, 2016) e desde então, a calda bordalesa é reconhecida como uma das descobertas mais valiosas para a agricultura. Em função disso, o cobre é utilizado até os dias atuais e desempenha importante papel para o desenvolvimento de programas fitossanitários (DAGOSTIN et al. 2011; SOUZA et al., 2014; MOCHIERO, 2014; LAHOZ et al., 2017; PEÑA et al., 2018; SATHIYABAMA; MANIKANDAN, 2018; STRAYER-SCHERER et al., 2018; KRISTL et al, 2019; ROLANDO et al., 2019; GE; COBINE; DONG et al., 2020; LA FUENTE, 2020).

O cobre é um metal de transição e micronutriente essencial às plantas, por participar de vários processos fisiológicos como a fotossíntese, respiração, distribuição de carboidrato, redução e fixação de nitrogênio (EVANS; SOLBERG; HUBER, 2007; YRUELA, 2009; CARVALHO; GUIMARÃES; BASTOS et al., 2010; BROADLEY et al., 2012). A absorção celular nas folhas ocorre quando o cobre bivalente (Cu^{2+}) é reduzido a monovalente (Cu) por ação da oxidase redutase férrica 4 e transferido para o interior da célula por meio da proteína

COPT6, responsável por redistribuir e remobilizar o metal na planta (PRINTZ et al., 2018). No solo, a disponibilidade do Cu é maior quando o pH é inferior a 5,0, em razão da sua forma iônica. O aumento do pH insolubiliza os íons para a forma de óxidos e hidróxidos e reduz sua disponibilidade no solo (ABREU; LOPES; SANTOS, 2007). Esse micronutriente está presente na solução do solo na forma cuprosa (Cu^+) e cúprica (Cu^{2+}) e, a sua absorção acontece nas raízes das plantas quando o Cu^+ é oxidado a Cu^{2+} . No entanto, a mobilidade do Cu no floema é limitada e por consequência disso, os sintomas de deficiência surgem inicialmente em folhas novas (YRUELA, 2009; CARVALHO; GUIMARÃES; BASTOS et al., 2010; BROADLEY et al., 2012), além disso, esses sintomas dependem da espécie e das interações com outros nutrientes (EVANS; SOLBERG; HUBER, 2007).

Consequentemente, o cobre na forma Cu^{2+} ao ser aplicado sobre as plantas é imediatamente absorvido e acumulado por patógenos sensíveis. No interior das células fúngicas o cobre forma complexos com enzimas de grupos sulfidríla, hidroxila, amino ou carboxila, interferindo em inúmeras reações enzimáticas, também desnaturam proteínas e bloqueiam as atividades respiratórias, daí seu efeito multissítio (MONTAG; SCHREIBER; SCHÖNHERR, 2006; LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

Como consequência de suas propriedades *redox*, o cobre pode ser tóxico, caso a sua concentração esteja acima dos níveis adequados (MALAVOLTA et al., 1997). Devido a isso, o seu excesso em concentrações acima de 30 mg.kg^{-1} ou deficiência, abaixo de 3 mg.kg^{-1} podem induzir diversas alterações nas plantas, como distúrbios no metabolismo, deficiência de outros nutrientes, clorose e necrose do tecido foliar, inibição do crescimento e até mesmo a morte (FERNANDES; HENRIQUES, 1991; KOPSELL; KOPSELL, 2007; CARVALHO; GUIMARÃES; BASTOS et al., 2010). Portanto, é importante manter os teores de cobre das plantas em faixas adequadas, pois o transporte de elétrons na fotossíntese é alterado em ambas as condições, com deficiência ou excesso de Cu (YRUELA, 2005; MALAVOLTA, 2006).

Normalmente a quantidade de cobre tóxica no citoplasma de células de patógenos é inferior ao teor encontrado nos vegetais para sua nutrição, de 10 a 20 mg.kg^{-1} (GRAHAM; WEBB, 1991; TOMAZELA et al., 2006). No entanto, os fungicidas cúpricos são recomendados em altas doses, de 1 a 2 kg de cobre metálico por hectare a cada aplicação, essas doses correspondem de 2 a 4 kg (1250 a 2500 mg.kg^{-1} de Cu^{2+}/ha) dos produtos com 50% de cobre (CUNHA, 2003).

Com relação aos teores foliares de Cu em cafeeiro, considera-se deficiência quando os teores são inferiores a 5 mg.kg^{-1} , de 5 mg.kg^{-1} a 7 mg.kg^{-1} são baixos, adequados entre 8

mg.kg⁻¹ e 16 mg.kg⁻¹, alto de 17 mg.kg⁻¹ a 25 mg.kg⁻¹ e o excesso é caracterizado quando os teores são superiores a 25 mg.kg⁻¹, em folhas coletadas no 3º ou 4º par dos ramos produtivos. (GUIMARÃES et al., 1999; MALAVOLTA, 2006). Para mudas, a faixa ideal varia entre 6,94 e 9,29 mg.kg⁻¹ (GONTIJO, 2007). Por isso, para manter a eficiência do controle da ferrugem do cafeeiro e aliá-la à redução de impactos ambientais, deve-se prezar por menores doses de Cu²⁺/ha, pois a faixa ideal de teor de cobre em plantas de cafeeiro é imensamente menor às doses comerciais recomendadas.

Diversos produtos à base de cobre são registrados para o controle de doenças de plantas, esses são formulados e comercializados como óxido cuproso (Cu₂O), hidróxido (Cu(OH)₂), oxiclreto (Cu₂Cl(OH)₃) e sulfato de cobre (CuSO₄), sendo esse último componente da calda bordalesa juntamente com a cal. (CABÚS, et al., 2017; AGROFIT, 2020). Os fungicidas cúpricos devem ser aplicados no momento adequado para proteger a planta, ou seja, antes da infecção do tecido vegetal. Por efeito do seu modo de ação preventivo, uma barreira química é formada e impede a colonização e germinação dos esporos. Além da aplicação foliar, os produtos à base de Cu também são usados no tratamento de sementes para garantir a formação de mudas sadias (VERMA et al. 2011; DIAS; CICERO; NOVENBRE, 2015; GOVERS et al., 2017).

2.2.1 Cenário atual

Há mais de um século o cobre é utilizado na agricultura no manejo de doenças de plantas, graças à descoberta do professor Millardet na França. Por causa dessa descoberta, as estratégias de manejo de diversas doenças baseiam-se na aplicação de fungicidas cúpricos, de modo a prevenir a colonização e germinação dos patógenos. Os altos níveis de Cu podem alterar a fertilidade do solo e causar fitotoxidez às plantas, comprometendo o rendimento e a qualidade das produções. O efeito negativo do cobre às plantas é favorecido por diversos fatores, entre eles o uso de formulações altamente solúveis, alta concentração, repetidas aplicações em curto intervalo de tempo, mistura de tanque com outros produtos, calda de pulverização com pH abaixo de 5,5 e altas temperaturas no momento da aplicação (MARTINS, 2005; BEHLAU et al., 2017; CABÚS, et al., 2017; ENGELHARDT, 2018; LAMICHHANE et al., 2018). Os fungicidas cúpricos são comprovadamente eficientes, entretanto, seu uso frequente pode acarretar efeitos deletérios ao meio ambiente e à saúde

humana (YRUELA, 2005; LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018). Desse modo, torna-se necessário desenvolver uma agricultura moderna e sustentável, alicerçada na sustentabilidade ambiental e na segurança alimentar.

Diante dos efeitos negativos do cobre, medidas para minimizar o impacto desse metal são criadas e regulamentadas. As regulamentações sobre os níveis máximos de cobre no meio ambiente dependem das legislações de cada país. Além disso, a regulamentação pode variar entre estados ou regiões de um mesmo país (ENGELHARDT, 2018; LAMICHHANE et al., 2018; LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018).

No Brasil, as concentrações limites de substâncias químicas no solo e em águas subterrâneas são regidas por órgãos ambientais, por meio dos chamados valores orientadores. O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA estabelece três valores orientadores com base em solos naturais e aqueles antropofizados, sendo o valor de referência de qualidade (VRQ), o de prevenção (VP) e o de investigação (VI). O VRQ leva em consideração os teores elementos-traços nos solos, sem a influência antrópica. Solos com valores menores ou iguais ao VRQ são considerados não contaminados, valores superiores ao VRQ indicam a contaminação do solo analisado. O VP é o valor limite de determinado elemento-traço no solo capaz de ainda sustentar as suas funções. O VP é um valor intermediário entre o VRQ e o VI. Por fim, o VI determina o valor da substância química e quando esses valores ultrapassam o VI, há o risco à saúde humana (CETESB, 2020).

São Paulo foi o primeiro estado brasileiro a adequar-se aos três valores orientadores. No Relatório de Estabelecimento de Valores Orientados para Solos e Águas Subterrâneas constou a primeira lista de valores orientadores para 37 substâncias. Estabeleceu-se então para o Cu, o VRQ de 35 mg.kg⁻¹, o VP de 60 mg.kg⁻¹, para solos agrícolas o limite do VI é de 760 mg.kg⁻¹, solos residenciais 2100 mg.kg⁻¹ e em solos industriais o limite máximo é de 10000 mg.kg⁻¹ (ENGELHARDT, 2018; CETESB, 2020). Em 2009 o Ministério do Meio Ambiente por meio do Conselho Nacional do Meio Ambiente estabeleceu para todo o Brasil os valores de VP adotados em São Paulo. Em Minas Gerais o VRQ foi estabelecido de acordo com a Deliberação Normativa COPAM 166/2011 e o VP seguiu as recomendações de São Paulo. Tanto o Ministério do Meio Ambiente, quanto o Estado de Minas Gerais estabeleceram limites de VI em 200, 400 e 600 mg.kg⁻¹ para solos agrícolas, residenciais e industriais, respectivamente (CONAMA, 2009; COPAM, 2011).

Na Europa, as leis sobre o uso de cobre são rigorosas e estão em constante mudança. Sendo assim, diversas frentes legais são formadas para estudar e avaliar os limites de cobre

usados na proteção de plantas, de modo a garantir a preservação do meio ambiente e a segurança alimentar. A União Europeia por meio da Diretiva CE de 21 de outubro de 2009 estabeleceu medidas sustentáveis para a proteção de plantas. Essa diretiva regimenta e promove o manejo integrado de pragas e doenças, e também a agricultura orgânica como abordagens para reduzir as aplicações de produtos químicos sintéticos (EUROPEAN UNION, 2009). Alguns países da União Europeia já proibiram o uso de fungicidas e bactericidas a base de cobre no sistema de produção convencional. Na Holanda e na Dinamarca, esses são proibidos também para a agricultura orgânica. Entretanto, muitos produtores temem por essa proibição total e preveem efeitos negativos aos sistemas produtivos. (KRISTL et al., 2018; LAMICHHANE et al., 2018). Enquanto isso, países como a Itália, França e Espanha limitaram o uso de cobre de acordo com o Regulamento (CE) nº 354/2014 da União Europeia (UE), para 6 kg.ha⁻¹ ao ano ou 30 kg.ha⁻¹ de Cu²⁺ por cinco anos. Essa quantidade é permitida na maior parte dos países europeus. Outros países como Alemanha, Áustria e Suíça adotaram um limite menor, de 3 a 4 kg.ha⁻¹ ao ano (WIGHTWICK et al. 2008; CABÚS et al., 2017). Em contrapartida, toda essa restrição pode impulsionar o aumento do uso de altas doses de fertilizantes foliares para controlar as doenças de plantas e assim mascarar o uso de fungicidas à base de cobre (LAMICHHANE et al., 2018; LA TORRE; IOVINO; CARADONIA, 2018). Outro ponto a ser considerado, diz respeito ao tipo de formulação e a dose recomendada do produto cúprico comercializado. Na Itália, as doses recomendadas variam de 0,693 kg.ha⁻¹ de hidróxido a 1,575 kg.ha⁻¹ de oxiclreto de cobre para o míldio da videira. Essa situação não é específica da Europa, por exemplo, no Brasil o oxiclreto de cobre é recomendado na dose de 2 a 6 kg/L.ha⁻¹ de produto comercial para ferrugem do cafeeiro, o óxido cuproso a 1,2 kg/L.ha⁻¹ e o hidróxido de cobre de 1,7 a 3 kg/L.ha⁻¹, respectivamente (PEREIRA, 2018). Esses produtos são comercializados com 35, 45, 50 e 75% de cobre metálico.

Em alguns casos, os problemas não resultam apenas das altas concentrações de cobre aplicado, mas também das decorrentes pulverizações realizadas. Na região norte da Itália, entre 12 e 14 pulverizações com cobre são realizadas anualmente para controlar o míldio em videiras, com dose recomendada de 1 kg de Cu por pulverização, ou seja, o dobro da quantidade limite (6 kg) por ano, estabelecida no Regulamento (CE) nº 354/2014 da UE (CABÚS, et al., 2017; LA TORRE; RIGHI; IOVINO; BATTAGLIA, 2019).

Com relação à agricultura orgânica, o controle de doenças nesse sistema baseia-se no uso de fungicidas cúpricos, pois o uso de outros tipos de fungicidas é proibido (LAMICHHANE et al., 2018). Essa situação chega a ser um tanto controversa, na Austrália o

uso da calda bordalesa, hidróxido e óxido de Cu são permitidos com base nos critérios das autoridades certificadoras, no entanto, o uso do oxiclureto de cobre não é permitido. Mesmo o uso de algumas formulações de cobre ser autorizado no sistema orgânico, a quantidade de Cu não pode exceder $6 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ao ano. Esse limite vigoraria até 31 de janeiro de 2019, porém, em 27 de novembro de 2018 por meio da Comissão Europeia foi publicado o relatório final de renovação das substâncias ativas compostas de cobre e nele ficou aprovado o uso de cobre na proteção de plantas por mais sete anos, porém, a dose limite foi reduzida para $4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, com vigência até 31 de dezembro de 2025 (SANTE, 2018; KRISTL et al., 2019; LA TORRE; RIGHI; IOVINO; BATTAGLIA, 2019). Em 2018 também foi renovada a aprovação das substâncias compostas por cobre como candidatas à substituição, por meio do Regulamento de Execução (EU) 2018/1981 publicado no Jornal Oficial da União Europeia em 13 de dezembro de 2018 (EUROPEAN UNION, 2018). Ou seja, doses menores de cobre ainda são permitidas na proteção de plantas, entretanto, estudos e levantamentos são realizados nos países participantes da União Europeia, a fim de aprovar novas substâncias com menor impacto ambiental e substituir as cúpricas.

A tendência para o futuro é reduzir ainda mais os limites de cobre permitidos na agricultura, por existir grande pressão por parte de políticos, ONG's, agricultores, movimentos sociais, ambientalistas, certificadoras e entre outros. A cada dia vemos a necessidade do desenvolvimento de fungicidas com baixo ou nenhum efeito deletério à natureza, capazes de realizar o controle das doenças em pequenas doses. Dessa forma, tudo leva a crer na evolução de um sistema de produção agrícola pautado no respeito ao meio ambiente e desenvolvido com base na sustentabilidade. Todavia, essa abordagem carece de mais estudos e comprovações, visto a importância do Cu para a proteção de plantas e das particularidades de cada patossistema. Provavelmente, seja uma oportunidade para a nanotecnologia contribuir no controle de doenças de plantas.

3 NANOTECNOLOGIA

O termo nanotecnologia foi usado inicialmente em 1974 por Norio Taniguchi (FERREIRA et al., 2017). A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar e estuda o uso de nanomateriais estruturados em uma ou mais dimensões (ZARBIN, 2007). Um nanomaterial pode ser definido como natural ou manufaturado contendo partículas, em estado agregado ou

não, no qual 50% ou mais das partículas com uma ou mais dimensões externas estiverem na faixa de tamanho entre 1 e 100 nanômetros (nm) (RAUCHER et al., 2015).

Com alto potencial de uso, a nanotecnologia é empregada em diversos segmentos como a agricultura, processamento e embalagens de alimentos, produtos farmacêuticos, medicina e suplementos nutricionais. Na agricultura moderna a nanotecnologia é uma importante tecnologia para a produção sustentável de alimentos, conservação de recursos naturais e a proteção de plantas (RANJAN et al., 2014; ELMER; MA; WHITE, 2018).

As nanopartículas (NPs) podem ocorrer naturalmente ou podem ser projetadas. As naturais são irregulares e variam em tamanho. Enquanto as projetadas são geralmente mais uniformes e podem ter formas únicas, como esferas, *nanosheets*, bastões e, em arranjos mais complexos, os tubos de múltiplas paredes (nanotubos de carbono) ou bifurcadas. As NPs projetadas podem ser fabricadas com dimensões específicas, por isso a sua utilidade é aplicável em diversas áreas com distintas funções (ELMER; WHITE, 2018).

Geralmente, as técnicas utilizadas na preparação de nanopartículas são agrupadas em dois métodos distintos, o físico e o químico. No físico, chamado também de *top down* (de cima para baixo), utiliza-se a moagem, têmpera, fotolitografia, decomposição térmica, irradiação, difusão, entre outros. O químico denominado *bottom up* (de baixo para cima) empregam agentes redutores como o citrato de sódio ou borohidreto de sódio. Outro procedimento usado é a sonicação e consiste na utilização da energia de ondas sonoras (ultrassom) aplicada sobre sistemas químicos para modificar o tamanho das partículas (COUTO, 2006; LOPES, 2017). Além desses, métodos biológicos também são utilizados com aplicação de fungos ou bactérias para produzir nanopartículas, sendo uma alternativa para evitar o uso de solventes orgânicos (SILVA, 2016). Diversas espécies dos gêneros *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Verticillium* spp. e *Penicillium* spp. são empregadas para biossintetizar nanopartículas (MOUSA et al., 2015; ELMER; WHITE, 2018). A caracterização das nanopartículas pode ser realizada por diversas metodologias, como por exemplo, a espectrofotometria UV-visível, a análise de difração de raios X (XRD), a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia eletrônica de transmissão, entre outras (RAJESHKUMAR; BHARATH, 2017).

O uso de nanopartículas no controle de doenças de plantas tem sido evidenciado nos últimos anos. Entretanto, a eficácia das nanopartículas depende do material utilizado para projetá-la, da sua absorção, translocação e acumulação no interior do tecido vegetal, além do seu tamanho, área superficial específica e forma. Apesar disso, a alta relação

superfície/volume garante às NPs uma melhor interação com as células dos microrganismos, em relação às partículas de mesma composição, porém em macroescala (RICO et al., 2011; MAGDALANE et al., 2016).

As nanopartículas já foram utilizadas para inibir o crescimento de fungos em pepino, arroz (KRISHNARAJ et al., 2012), milho (ADHIKARI et al., 2015), cacau (GALLARDO et al., 2016), tomate (KUMARI et al., 2017) e café (PÉREZ, 2018; CARVALHO, 2019), entre outras culturas. Todavia, os estudos em Fitopatologia sobre a sua utilização ainda são iniciais, sendo necessário intensificar as pesquisas sobre a utilidade de nanopartículas no manejo de doenças de plantas (ELMER; WHITE, 2018). Dentre as investigações do uso das NPs no controle de doenças de plantas, a prata (Ag), o óxido de cobre (CuO) e o óxido de zinco (ZnO) promoveram os efeitos mais consistentes na supressão de doenças em diversas culturas, em relação à outros elementos estudados (ELMER; WHITE, 2018). O primeiro estudo sobre NP de prata na supressão de doenças de plantas foi publicado em 2006 (PARK et al., 2006) e sobre o uso de NP de cobre somente em 2013 (ELMER et al., 2018).

3.1 Nanopartículas de prata no controle de doenças de plantas

As nanopartículas de Ag são as mais utilizadas com a finalidade de controlar microrganismos, devido à sua baixa volatilidade, estabilidade elevada e ampla atividade antimicrobiana (PULIT et al., 2013). Os efeitos positivos dessas NPs no manejo de doenças de plantas foram evidenciados em diversos estudos. Lamsal et al. (2011a) avaliaram o efeito da nanopartícula de prata sobre o oídio em cucurbitáceas. Os autores trabalharam com quatro concentrações de nanopartícula de prata (10, 30, 50 e 100 mg.L⁻¹) e dois fungicidas comerciais como controle positivo, sendo o negativo, a água destilada para supressão. A incidência do oídio reduziu conforme o aumento da concentração da NP de Ag, sendo 57,8, 48,8, 40,2 e 20% nas concentrações citadas acima, depois de observados os sintomas da doença. De maneira semelhante, a incidência da doença foi reduzida em 45, 40, 27 e 18% nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 mg.L⁻¹ de nanopartículas de prata aplicadas antes da inoculação do patógeno, respectivamente. Esses mesmos autores, utilizaram as doses de 10, 30, 50 e 100 mg.L⁻¹ de nanopartículas de prata *in vitro*. Eles trabalharam com isolados de diferentes espécies de *Colletotrichu*, esses foram tratados com as diferentes concentrações das NPs de Ag. Na concentração de 100 mg.L⁻¹ o crescimento micelial dos isolados C3 e C5 foi

completamente inibido. E nos isolados C7 e C8 a inibição chegou a 90% (LAMSAL et al., 2011b).

Demais autores também testaram a capacidade da nanopartícula de prata em controlar outros agentes fúngicos. Por exemplo, essas foram adicionadas ao meio de cultura nas doses de 1, 10, 50 e 100 mg.L⁻¹ e de acordo com os autores, os íons de Ag inativaram os grupos tiol da parede celular fúngica, causando a sua ruptura, interrompendo o metabolismo energético e a cadeia de transporte de elétrons. Em razão disso, a dose de 100 mg.L⁻¹ promoveu maior redução do crescimento micelial de *Ophiostoma flexuosum*, *O. tetropii*, *O. polonium* e *O. ips* em 100%, 81%, 68% e 46%, respectivamente (VELMURUGAN et al., 2009).

Em outro trabalho, Kumari et al. (2017) estudaram o papel das NPs no controle da *Alternaria solani* em tomate e utilizaram a NP de Ag sintetizada por *Trichoderma viride*. Os autores observaram *in vitro*, a redução de 100% na contagem de esporos após o 3º dia de tratamento e redução de 73,3% na biomassa desse fungo após o 7º dia. *In vivo*, foi realizada a aplicação foliar de 5 µg.mL de nanopartícula de prata para controlar *A. solani*, em plantas de tomateiro. Houve a redução do número de esporos de *A. solani* de 5,1 x10⁵ para 1,05x10⁵ esporos/folha, nas plantas tratadas com nanopartícula de prata, em relação às não tratadas. Segundo os autores, esses resultados indicam o potencial da nanopartícula de prata como inibidor de crescimento micelial. Também ocorreu aumento significativo de 32,6% no peso dessas plantas frescas, em comparação às plantas não tratadas.

A fim de estudar o efeito em *Meloidogyne incognita*, NP de Ag extraída de *Urtica urens* foram utilizadas para controlar o nematoide das galhas. Os extratos foram reduzidos a partir de nitrato de prata, éter de petróleo (PE), acetato de etila (EA) e etanol absoluto. A eficácia dos extratos naturais de *U. urens* no manejo de *M. incognita* comparado ao nematicida comercial (Rugby®) e suas formulações de tamanho nano (Ag-rugby, Ag-PE, Ag-EA e Ag-E) foram analisadas em laboratório. O tratamento Ag-rugby proporcionou a maior controle (100%) da eclosão dos ovos na LC50 de 5,62 mg.L⁻¹. Para o Rugby® a LC50 de 7,21 mg.L⁻¹ reduziu 78% da eclosão. Entre os extratos, o Ag-PE proporcionou a maior supressão (19,55) de eclosão dos ovos (LC50 de 28,77 mg.L⁻¹) (NASSAR, 2016). Portanto, sejam as NPs de Ag utilizadas como elementos principais ou como condutores de moléculas, os seus efeitos positivos no controle de microrganismos são evidentes.

3.3.1 Toxicidade das nanopartículas de prata ao meio ambiente

Apesar dos efeitos benéficos da nanopartícula de prata no controle de microrganismos, o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido (DURÁN, et al., 2018; ZORRAQUÍN-PEÑA et al., 2020). Atualmente, muitos questionamentos sobre os verdadeiros efeitos da nanopartícula de prata no meio ambiente são levantados para compreender sua toxicidade. Dessa forma, é preciso entender como suas propriedades físico-químicas e morfológicas agem no ser humano e no ambiente, para então determinar quais são seus impactos negativos (DURÁN, et al., 2018). De acordo com estudos recentes, a toxicidade da NP de Ag depende da formação de Ag^+ nos meios biológicos. No interior das células ocorre a liberação de Ag^+ , o qual pode promover a morte celular por meio do estresse oxidativo (DE LIMA et al., 2012; DURÁN et al., 2016).

As primeiras iniciativas com o intuito de reunir informações sobre os efeitos nocivos dos nanomateriais à saúde e ao ambiente foram realizadas por meio da Royal Society e da Royal Academy of Engineers e do NSTC americano (subcomitê do National Science and Technology Council). No Reino Unido, a Royal Society e a Royal Academy of Engineers publicaram em 2004 um estudo sobre os riscos ambientais à saúde, à segurança e as implicações éticas e sociais associadas ao desenvolvimento da nanotecnologia e as áreas onde a regulamentação deve ser considerada. Em 2006 o NSTC emitiu o relatório "Environmental, health and safety research needs for engineered nanoscale materials", no qual informa sobre o potencial risco dos materiais em nanoescala e como esses podem ser utilizados em produtos de consumo, tratamentos médicos, aplicações no meio ambiente ou em pesquisas (NNI, 2006). No ano de 2007 a agência de proteção ambiental americana (United States Environmental Protection Agency – U.S. EPA) publicou o documento "Nanotechnology White Paper" para servir como instrumento de reflexão para o desenvolvimento da nanotecnologia com base em seus benefícios e riscos (U.S.EPA, 2007). A União Europeia por meio da Registration, Evaluation, Authorisation & Restriction of Chemicals Competent Authorities (REACH CA) formulou e publicou o mais recente material sobre regulamentação. Na REACH CA há um subgrupo de trabalho destinado a regulamentar a manufatura, importação, comercialização e o uso de nanomateriais, de forma a evitar impactos negativos à sociedade. De maneira geral, o sistema REACH abrange as etapas de registro, avaliação, autorização e restrições para a comercialização de uma substância em nanoescala, seja ela constituinte minoritário de uma matriz ou presente como componente majoritário (EUROPEAN UNION, 2018).

Em de janeiro de 2020 as empresas químicas fabricantes ou importadoras de nanomateriais foram obrigadas a cumprir os requisitos de informação para nanomateriais em seus dossiês de registro REACH CA, conforme determinado no Regulamento da Comissão (UE) 2018/1881 de 3 de dezembro de 2018 (EUROPEAN UNION, 2018). Para isso, as empresas precisam determinar se os produtos se enquadram na recomendação da Comissão Europeia (CE) sobre a definição de nanomaterial, adotada em 2011. Essas também precisam caracterizar a(s) nanoforma (s) de acordo com os novos requisitos e demonstrar uso seguro para saúde humana e meio ambiente (ARCADIS, 2020).

Com relação aos valores limites de exposição de prata no meio ambiente, nos Estados Unidos esses podem variar de acordo com o órgão regulamentador, com valores entre 0,1 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de prata metálica ou solúvel. No entanto, níveis de prata na água potável norte americana são encontrados em torno de 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (DURÁN et al., 2018). Enquanto no Brasil, a legislação estabelece nas águas potáveis um limite de 10 $\mu\text{g/L}$ de prata total (CONAMA, 2005).

Diante do exposto, o uso da nanopartícula de prata na agricultura pode ser limitado devido ao risco ao meio ambiente ou até mesmo inviável se também for considerado o seu custo de aquisição. Outro ponto desfavorável diz respeito à síntese da nanopartícula de prata, majoritariamente obtidas de métodos químicos, por meio da utilização de ácidos tóxicos.

3.2 Nanopartículas de cobre no controle de doenças de plantas

Micronutrientes essenciais às plantas na forma de nanopartículas, como o zinco (Zn) e o cobre (Cu) também são utilizados com o objetivo de controlar as doenças de plantas. Em plantas de citros, NP Zn foi aplicada na dose de 0,56 kg.ha^{-1} , os autores do trabalho relataram a redução de 38% e 42% da incidência de cancro cítrico, em dois ensaios avaliados, respectivamente. Em relação aos produtos convencionais utilizados no manejo da doença, os autores citam como vantagens da NP Zn o movimento translaminar do produto e a menor toxicidade em relação a diferentes formulações dos produtos convencionais utilizados (GRAHAM et al., 2016). Ainda sobre a NP Zn, a inibição significativa do crescimento de *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* foi observada em concentrações superiores a 250 mg.L^{-1} de NP de Zn (HE et al., 2011).

O cobre na forma de nanopartículas só foi estudado no manejo de doenças em 2013 (ELMER et al., 2018). No entanto, grandes avanços já foram realizados após esse primeiro estudo. Por exemplo, observou-se menor área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de tomateiro cultivado em solo com a presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Na concentração de 1000 mg.L⁻¹ as NPs de CuO, MnO e ZnO proporcionaram a redução da AACPD em 31%, 28% e 28%, respectivamente, quando comparadas às plantas não tratadas (ELMER; WHITE, 2016).

As nanopartículas de Cu também foram utilizadas para controlar *Podosphaera pannosa*. Não foram visualizados sinais do fungo em folhas de roseira, independente da concentração utilizada. Na concentração de 50 mg.L⁻¹ algumas hifas frágeis foram observadas, mas na concentração de 200 mg.L⁻¹ não foi detectado nenhum sintoma da doença, 19 dias após a inoculação do patógeno (HAO et al., 2019).

A composição, forma e as diferenças na taxa de liberação de Cu²⁺, podem interferir nos efeitos benéficos das nanopartículas na agricultura. Em melancia, ‘nanosheets’ (nanoestrutura bidimensional) de Cu₃(PO₄)₂·3H₂O a 10 mg.L⁻¹ suprimiram significativamente a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*), proporcionando decréscimo de 58% no progresso da doença. Com o uso de NPs CuO, os efeitos na redução da doença foram significativos somente na concentração de 1000 mg.L⁻¹ (BORGATTA et al., 2018).

Fungos fitopatogênicos representados por *Alternaria* spp., *Aspergillus niger*, *Pythium* spp. e *Fusarium* spp. foram obtidos e transferidos para placas contendo diferentes concentrações de nanopartículas de cobre (5,10,15 e 20 mM). O tratamento controle foi preparado usando meio de cultura sem nanopartículas. O crescimento radial das colônias fúngicas foi registrado após cinco dias. A inibição máxima das colônias foi de 57,14, 63,81 e 58,05% em *Alternaria* spp., *Aspergillus niger* e *Pythium* spp., respectivamente, na concentração de 20mM (concentração máxima), no entanto, para *Fusarium* spp. a inibição foi de apenas uma 42,61% (HASSAN et al. 2018). Em outro trabalho, as NPs de CuO sintetizadas demonstraram a maior efetividade em *Fusarium oxysporum*, *Phoma destructive*, *Curvularia lunata* e *Alternaria alternata*, inibindo o crescimento das colônias para 24, 22, 21 e 18 mm respectivamente (KANHED et al., 2011).

Para verificar a eficiência das nanopartículas de Cu, essas foram comparadas ao Cu multivalente e o Cu de amônio quaternário no controle de *Xanthomonas perforans*, resistente ao cobre. As NPs Cu reduziram significativamente a severidade da doença bacteriana no campo e também em casa de vegetação, quando comparados aos fungicidas cúpricos e aos

controles. Provavelmente, as NPs Cu liberaram maiores quantidades de íons ativos de Cu^{2+} , sendo capazes de penetrar nas membranas bacterianas com maior efetividade (STRAYER-SCHERER et al., 2018).

A eficácia das nanopartículas depende do seu material, absorção, translocação e acumulação no interior do tecido vegetal. Características como a forma e a área superficial específica são fatores determinantes para a sua eficiência. Portanto, a alta relação superfície/volume da NP permite a melhor interação com as células dos microrganismos (RICO et al., 2011; MAGDALANE et al., 2016). A capacidade fúngica das NPs e seus efeitos nutricionais, dependendo do elemento, são os principais motivos para utilizá-las em baixas concentrações para inibir a ação de fitopatógenos. Outro ponto importante, diz respeito à durabilidade e resistência ao calor (PÉREZ, 2018). Com toda certeza, essas são as principais vantagens das nanopartículas.

As nanopartículas podem ser adquiridas de empresas especializadas na produção e comercialização desse tipo de material, com diferentes níveis de pureza e tamanho. A NP de Ag pode ser comprada por R\$ 3372,00 em embalagens de 100 gramas, de acordo com a cotação atual do dólar (\$5,62). A NP de Cu por sua vez possui valores mais atrativos, em torno de R\$ 310,00 a embalagem de 100 gramas (US RESEARCH NANOMATERIALS, 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas Experimentais

Foram realizados cinco experimentos (I, II, III, IV e V) independentes. As nanopartículas de cobre (óxido de cobre; granulometria: 40 nm; pureza: 99%) e prata (granulometria: 20 nm; pureza: 99,99%) utilizadas nos experimentos foram adquiridas da empresa US Research Nanomaterials, Inc. (Houston, TX). Diversos autores já comprovaram a maior eficiência das NPs de Ag e Cu em relação a outras (ELMER et al., 2018; ELMER; WHITE, 2018; PÉREZ, 2018; CARVALHO, 2019). Com base nisso, essas foram selecionadas e empregadas nos experimentos a seguir.

O experimento I, *in vitro*, realizado para avaliar a germinação de uredosporos de *H. vastatrix* em diferentes doses de nanopartícula de cobre (NPCu) e nanopartícula de prata (NPAg) foi conduzido em Laboratório.

Os experimentos II e III, para avaliar o manejo da ferrugem em mudas de cafeeiro (cv. Catuaí Vermelho IAC-144) promovido por NPAg e NPCu e o IV visou comparar a eficiência da NPCu em relação a outras fontes de cobre. Ambos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e, utilizadas mudas da cv. Catuaí 144 com seis pares de folhas.

Já o experimento V foi realizado para determinar a eficiência da NPCu (200 mg.L⁻¹) no manejo da ferrugem do cafeeiro no campo.

Todos os experimentos realizados em casa de vegetação foram repetidos ao menos uma vez.

4.1.1 Obtenção de inóculo e inoculação de *H. vastatrix*

Folhas de *C. arabica* naturalmente infectadas foram coletadas no campo. As folhas foram submetidas à câmara úmida por 24 horas. Passado esse período, essas foram lavadas com água destilada e os uredosporos raspados com o auxílio de um pincel para um Becker de vidro. A suspensão obtida foi ajustada em Câmara de 'Neubauer' para a concentração de $1,0 \times 10^5$ uredosporos/mL e aplicada com pulverizador plástico manual na face abaxial de todas as folhas das mudas de cafeeiro até o ponto de escorrimento (MARCOLINO, 2019). Em seguida, as mudas foram cobertas com sacos plásticos pretos por 72 horas para fornecer as condições ideais à penetração do fungo, como a ausência de luz, o molhamento foliar e temperatura entorno de 23°C (RAYNER et al., 1961; CRUZ FILHO; CHAVES, 1973; KUSHALAPPA et al., 1989). Após 72 horas os sacos plásticos foram retirados e as mudas colocadas em bancada na casa de vegetação a 25°C ± 3°C, seguindo o delineamento em blocos casualizados.

4.2 Efeito das nanopartículas de Ag e Cu na germinação de uredosporos de *H. vastatrix*

4.2.1 Experimento I

Para verificar a influência das nanopartículas de Ag e Cu na germinação dos uredosporos de *H. vastatrix*, realizou-se teste *in vitro*, em placas de microtitulação (ELISA) com capacidade de 200 µL por cavidade. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 + 1 e oito repetições. As nanopartículas de Ag e Cu constituíram o fator A e as concentrações (0, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹) o fator B, também foi utilizado o fungicida (epoxiconazol + piraclostrobina) como tratamento adicional. Cada cavidade da placa foi considerada como uma parcela experimental.

Inicialmente preparou-se solução estoque a 2000 mg.L⁻¹ de cada uma das nanopartículas. As concentrações utilizadas no experimento foram obtidas a partir da diluição da solução estoque. O inóculo foi obtido a partir de folhas de caféiro coletadas no campo, naturalmente infectadas. As pústulas foram raspadas com pincel para um Becker de vidro, contendo água destilada esterilizada, em seguida a suspensão foi calibrada em Câmara de Neubauer para a concentração de 1x10³ uredosporos de *H. vastatrix*/mL.

Nas cavidades de cada repetição foram pipetados 5 µL, 10 µL, 20 µL e 40 µL das nanopartículas. Para completar o volume total das cavidades foram pipetados 195 µL, 190 µL, 180 µL, 160 µL de suspensão de inóculo de *H. vastatrix* para as concentrações de 0, 50, 100, 200 e 400 mg.L⁻¹, respectivamente. Para o cálculo do fungicida, considerou-se 3 mL do produto para 1L de calda, de acordo com a dose comercial registrada para o patossistema. Dessa forma, foram pipetados 0,5 µL da calda do fungicida nas cavidades e 199,5 µL da suspensão de uredosporos para completar o volume.

As placas foram mantidas em BOD à 23°C ± 2°C por 18 horas, em escuro total. Após esse período, foram adicionados 0,5 µL de lactoglicerol para paralisar a germinação dos uredosporos. Foram avaliados 100 uredosporos aleatoriamente de cada repetição da placa de microtitulação, em microscópio de luz, com capacidade de aumento em 400x. Os uredosporos foram considerados germinados quando o comprimento do tubo germinativo era duas vezes o seu tamanho.

4.3 Nanopartículas metálicas no manejo da ferrugem em mudas de caféiro

4.3.1 Experimentos II, III e IV

Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar em torno de 90%. As mudas de cafeeiro da cv. Catuaí Vermelho IAC-144 suscetíveis à ferrugem foram adquiridas de viveiro comercial com seis pares de folhas, sendo utilizadas em todos os experimentos.

O experimento II foi instalado no delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com cinco tratamentos e quatro repetições. As doses de 0 (testemunha), 50, 100, 200 e 400 mg.L^{-1} de NPCu foram utilizadas para compor os tratamentos. As mesmas doses foram utilizadas no experimento III, porém, para a NPAg. O delineamento utilizado também foi o DBC com quatro repetições. Em ambos os experimentos foi utilizado um fungicida registrado para o controle da ferrugem (epoxiconazol + piraclostrobina) como tratamento adicional. As parcelas experimentais foram formadas por quatro mudas em saquinhos de polietileno (10 x 20 cm).

O experimento IV foi instalado em DBC, com quatro repetições. Cada parcela experimental foi composta por três mudas em saquinhos de polietileno (10 x 20 cm). As mudas de cafeeiro foram submetidas a seis tratamentos, sendo eles: NPCu (250 mg.L^{-1}), hidróxido de cobre (1750 mg.L^{-1}), óxido cuproso (625 mg.L^{-1}), cobre quelatizado com EDTA (Cu EDTA) e uma testemunha (água).

Os tratamentos de cada experimento foram aplicados sete dias antes da inoculação dos esporos de *H. vastatrix* na face abaxial das folhas até o ponto de escorrimento (MARCOLINO, 2019).

4.4 Nanopartículas no manejo da ferrugem do cafeeiro em plantas adultas

4.4.1 Experimento V

O experimento VI foi realizado na Fazenda Boca da Mata em Lavras-MG ($21^{\circ}12'51''\text{S}$, $44^{\circ}57'42.57''\text{O}$, altitude de 966 metros), em lavoura formada por plantas de cafeeiro de cultivar do grupo Mundo Novo em fase de produção, no espaçamento de 3,4 m entre linhas e 1,0 m entre plantas, totalizando uma população de $3333 \text{ plantas.ha}^{-1}$. O experimento foi implantado em dezembro de 2019 e finalizado em maio de 2020.

Nesse experimento, avaliou-se o efeito das nanopartículas de micronutrientes (Cu, Zn, B e Mn), em associação ou não com fungicidas químicos e biológicos.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições e sete tratamentos, sendo eles o T1: testemunha sem aplicação; T2: Fungicida; T3: NPs Cu + Zn + B + Mn; T4: NPs Cu + Zn + B + Mn + *Bacillus subtilis*; T5: NPs Cu + B + Fungicida; T6: NPs Cu + B + Fungicida + *B. subtilis*; T7: Fungicida + ácido bórico + Cu EDTA. Cada parcela experimental foi constituída por seis plantas, sendo as quatro plantas centrais a parcela útil, perfazendo 21 parcelas experimentais.

Foram utilizados os seguintes produtos comerciais, o fungicida (TRIZIMAN® - azoxistrobina + mancozebe + ciproconazol, 2 kg.ha¹), os agentes de controle biológico (BIOBACI® - *B. subtilis*, 2 kg.ha¹) e o Cu EDTA (KELLUS COPPER® - 14,5% de Cu²⁺, 0,5 kg.ha¹). Realizou-se uma única aplicação dos tratamentos em 17/12/2019 e, as avaliações de incidência e enfolhamento foram realizadas em 17/12/19, 15/01/20, 12/02/20, 15/03/20, 10/04/20 e 16/05/20.

Para a aplicação dos tratamentos, utilizou-se um pulverizador costal motorizado da marca STIHL® modelo SR 430 com quantidade de vazão média de 1,5 L/min. O volume de calda utilizado para todos os tratamentos foi de 400 L.ha⁻¹. As caldas foram preparadas na área experimental ao final da tarde e imediatamente pulverizadas. Utilizou-se como adjuvante o óleo vegetal (AUREO® - 0,25%).

5 VARIÁVEIS ANALISADAS

Para os experimentos em casa de vegetação, as avaliações da incidência e severidade da ferrugem foram realizadas semanalmente, a partir dos primeiros sinais do patógeno, totalizando cinco avaliações.

A incidência foi obtida da relação entre o número de folhas lesionadas e o número total de folhas avaliadas por parcela, de acordo com a equação 1:

(1)

Sendo:

I(%): incidência da doença, em porcentagem;

NFD: número de folhas doentes;

NTF: número total de folhas avaliadas.

A severidade foi avaliada com o auxílio da escala diagramática proposta por Cunha et al. (2001). Foram atribuídas notas 1 a 6 (1 – de 0 a 3% de severidade; 2 – de 3 a 6% de severidade; 3 – de 6 a 12% de severidade; 4 – de 12 a 25% de severidade; 5 – de 25 a 50% de severidade; 6 – mais de 50% de severidade).

Os valores médios da incidência e da severidade foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), segundo a equação 2 (SHANER; FINNEY, 1977).

(2)

Onde:

AACPD = área baixo da curva de progresso da doença;

Y_i = proporção da doença na i -ésima observação;

T_i = tempo, em dias, na i -ésima observação;

n = número total de observações.

Finalizadas as avaliações supracitadas, coletou-se toda a parte aérea das mudas. As amostras foram lavadas com água destilada e armazenadas em sacos de papel para serem secas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C por três dias, até atingirem peso constante. Após a secagem, determinou-se o peso de planta seca (PPS) balança de precisão.

No experimento V determinou-se a incidência (equação 1) da ferrugem e também o enfolhamento das plantas, segundo escala diagramática desenvolvida por Boldini (2001). Os valores foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e área abaixo da curva de progresso do enfolhamento (AACPE) (equação 2).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis analisadas em cada experimento foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e Batlett ($p > 0,05$) para verificar os pressupostos da análise de variância.

Como os pressupostos foram atendidos, os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F $p \leq 0,05$) e quando significativo, as variáveis qualitativas foram comparadas por Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) ou por contraste ortogonal com o tratamento adicional. Para as variáveis quantitativas foi realizado o ajuste de modelos lineares e não lineares, por análise de regressão.

Realizou-se a análise conjunta dos experimentos repetidos no tempo para verificar se houve diferença entre os mesmos.

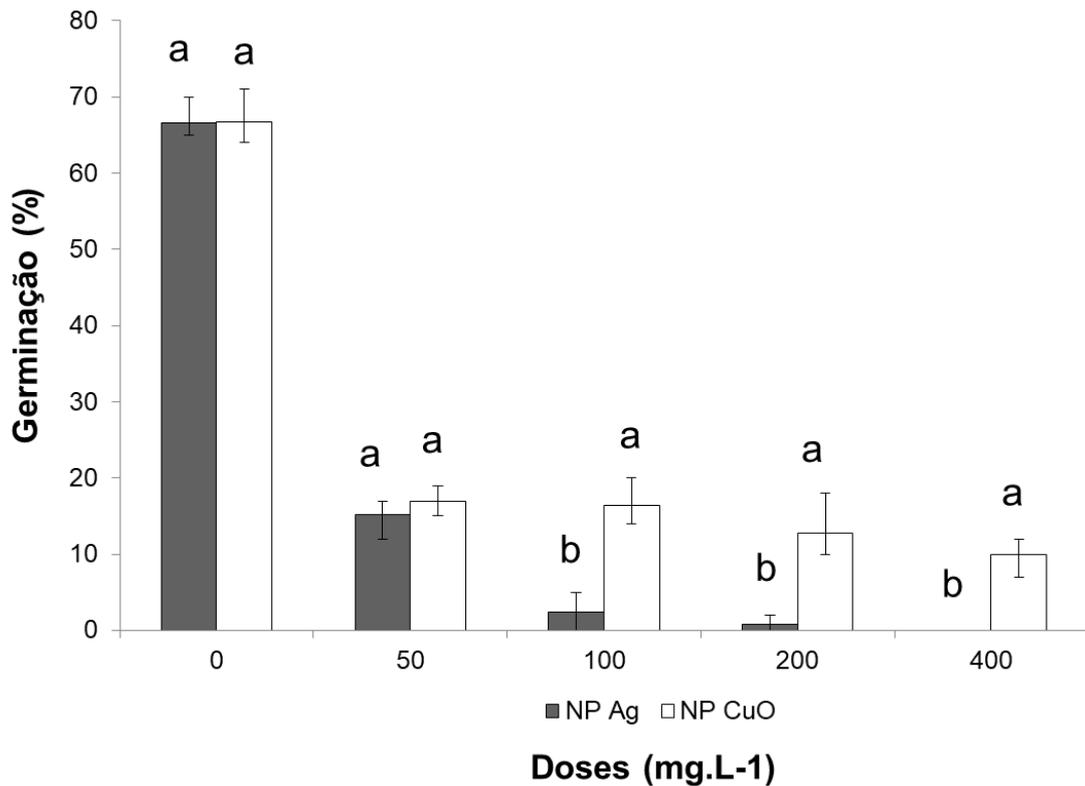
7 RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre os experimentos repetidos no tempo para as variáveis analisadas ($p < 0,05$). Portanto, utilizou-se a média dos valores desses experimentos (Anexo A - Tabelas M a U). Nenhum sintoma de fitotoxidez foi observado nos experimentos.

7.1 Experimento I - Efeito das nanopartículas de Ag e Cu na germinação (%) de uredosporos de *H. vastatrix*.

Houve interação significativa ($p < 0,01$) entre as NPs e suas respectivas doses para a germinação de uredosporos de *H. vastatrix*. Houve também diferença significativa ($p < 0,001$) para o contraste Tratamento adicional vs Fatorial, ou seja, a redução dos esporos germinados foi diferente entre as NPs e o fungicida (Anexo A - Tabela A). A NP_{Ag} independente da sua dose foi mais eficiente para reduzir a porcentagem de esporos germinados, quando comparada à NP_{Cu}. A porcentagem de esporos germinados foi semelhante na dose de 0 mg.L⁻¹ (Figura 1).

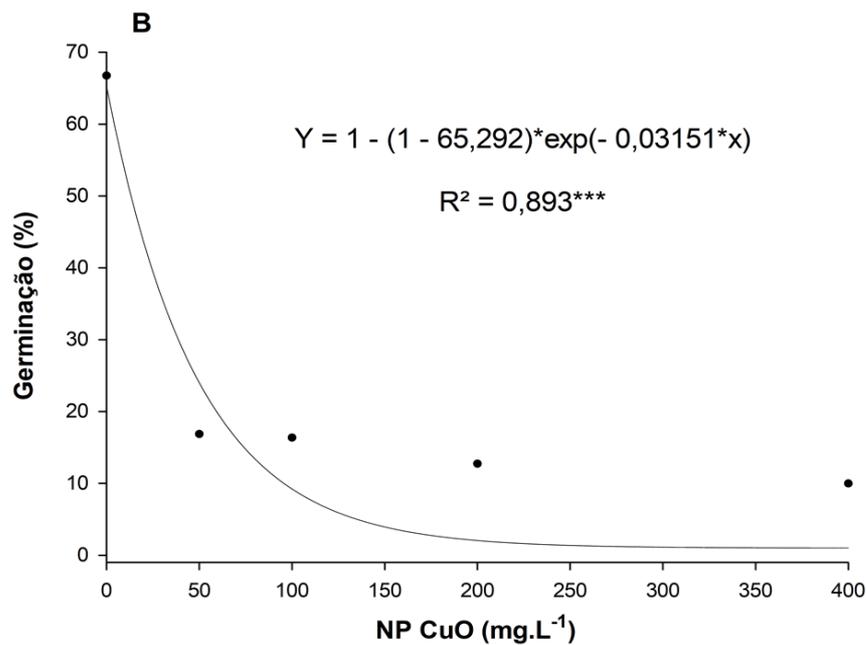
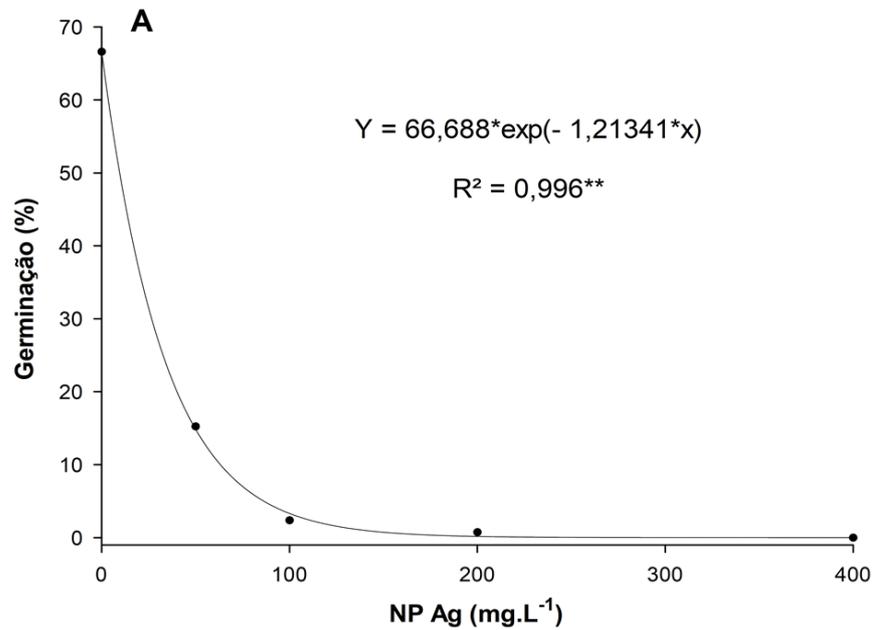
Figura 1 – Germinação (%) de esporos de *H. vastatrix* submetidos a tratamentos com diferentes doses de nanopartículas de Ag e Cu. Lavras, MG, 2020.



Fonte: Do autor (2020).

Os maiores valores de esporos germinados ocorreram sem adição de nanopartículas (dose de 0 mg.L⁻¹), com cerca de 70% de germinação. Conforme o aumento das doses das nanopartículas houve o decréscimo da porcentagem de germinação, no qual o modelo monomolecular promoveu o melhor ajuste da curva. A NP Ag reduziu a germinação em 77% a partir da dose de 50 mg.L⁻¹. Nas doses de 100 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹ e 400 mg.L⁻¹ a redução de esporos germinados foi de 96,4%, 98,9% e 100%, respectivamente (Figura 2A). Para a NPCu a maior redução ocorreu na dose de 400 mg.L⁻¹ (85%), seguida das doses de 200 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹, com cerca de 80,9%, 75,5% e 74,7% de esporos germinados, respectivamente (Figura 2B).

Figura 2 - Efeito das nanopartículas de prata (A) e óxido de cobre (B), testadas em diferentes doses, sobre a germinação (%) de uredosporos de *H. vastatrix*. Lavras, MG, 2020.



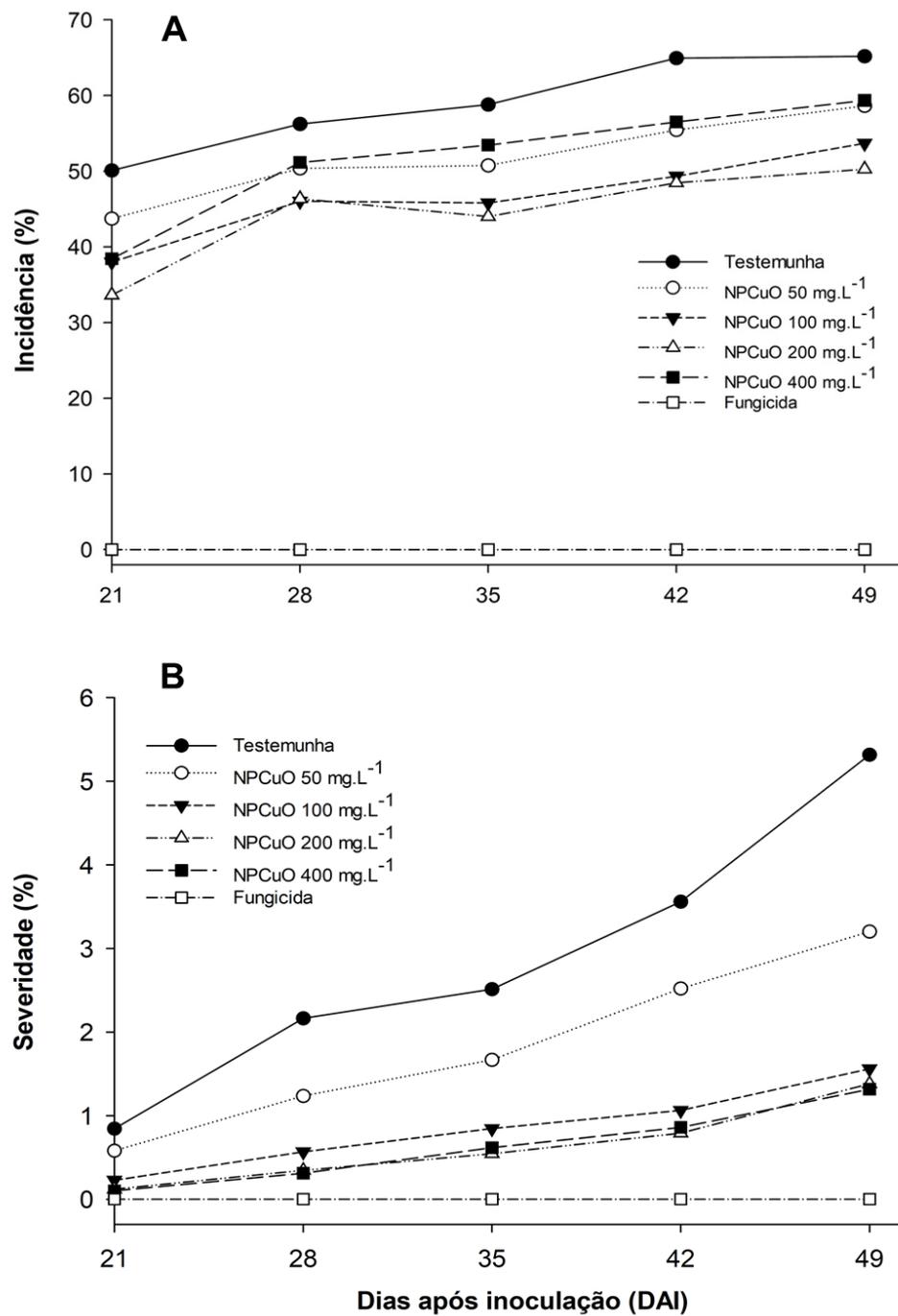
Fonte: Do autor (2020).

7.2 Experimento II – Manejo da ferrugem (*H. vastatrix*) do cafeeiro em função de doses crescentes de nanopartículas de cobre (NPCu).

Os primeiros sinais do patógeno foram observados aos 21 dias após a inoculação (DAI). A ferrugem afetou todas as plantas durante o período de condução do experimento, com exceção para as mudas tratadas com o fungicida (epoxiconazol + piraclostrobina). Aos

21 DAI observou-se a menor incidência (33,6%) e, aos 49 DAI a maior (65,2%) (Figura 3A). A severidade aumentou com o tempo, variou de 0,12% aos 21 DAI para 5,9% aos 49 DAI (Figura 3B).

Figura 3 - Curva de progresso da incidência (A) e severidade (B) da ferrugem (*H. vastatrix*) em mudas de cafeeiro aos 21, 28, 35, 42 e 49 DAI em função das doses de NPCu aplicadas. Lavras, MG, 2020.

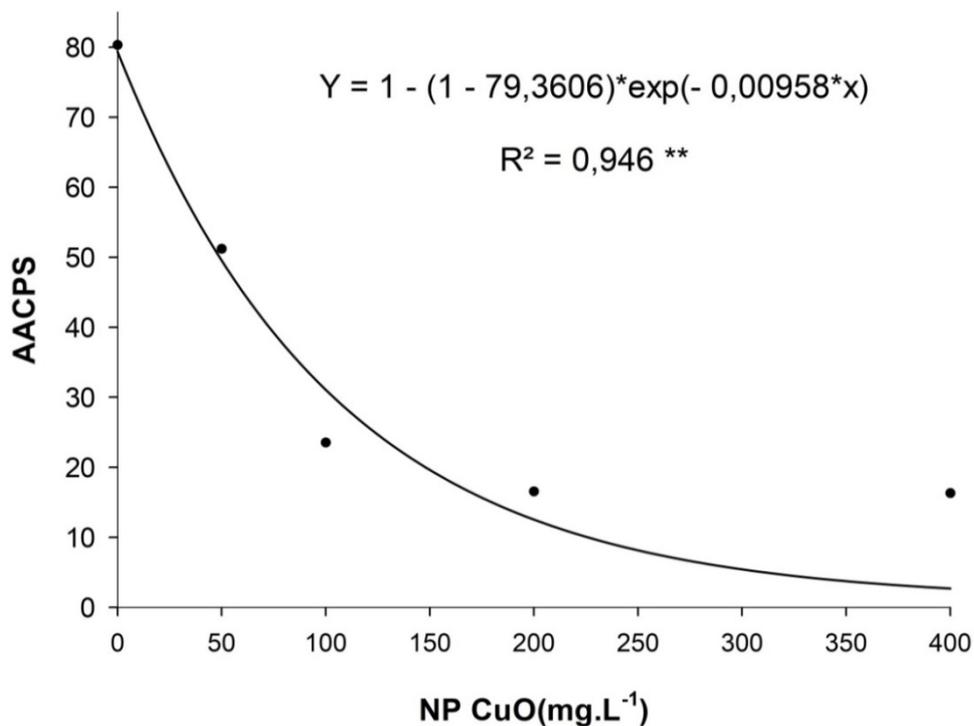


Fonte: Do autor (2020).

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) das doses de NPCu para a AACPS. Ocorreu interação significativa ($p < 0,05$) no contraste Tratamento adicional vs Doses NPCu para a AACPS (Anexo A - Tabelas B, C e D), ou seja, houve diferença entre as doses da NPCu e o fungicida na redução da ferrugem do cafeeiro.

Todas as doses aqui testadas (com exceção da dose 0 mg.L^{-1}) foram eficientes no controle da ferrugem. Observou-se a redução da AACPS conforme o aumento das doses de NPCu, na dose de 50 mg.L^{-1} a redução foi de 37% e na de 100 mg.L^{-1} chegou a 60%, ambas em relação à testemunha. A maior redução ocorreu nas doses de 200 mg.L^{-1} e 400 mg.L^{-1} , alcançando 84,2% e 97,5%, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 – Área abaixo da curva de progresso da severidade - AACPS da ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*) em função de doses crescentes de NPCu. Lavras, MG, 2020.



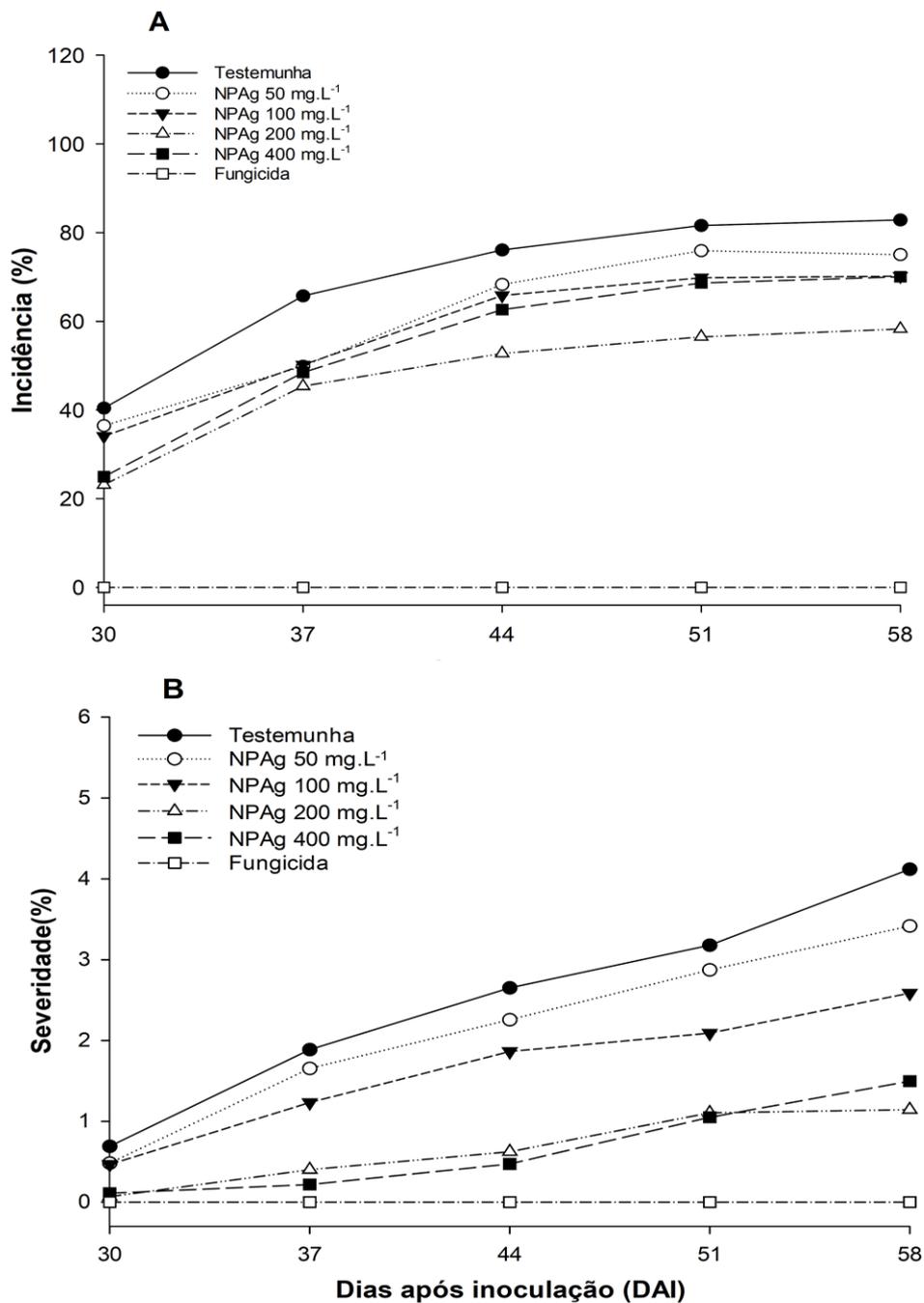
Fonte: Do autor (2020).

7.3 Experimento III - Manejo da ferrugem (*H. vastatrix*) do cafeeiro em função de doses crescentes de nanopartículas de prata (NPAg).

Houve incidência de ferrugem durante todo o período de avaliação do experimento, com exceção para as mudas tratadas com o fungicida (epoxiconazol + piraclostrobina). A

testemunha (0 mg.L⁻¹) proporcionou os maiores níveis de incidência aos 58 DAI (82,9%), a menor incidência (23,1%) foi observada aos 30 DAI (Figura 5A). A menor severidade foi de 0,1%, observada aos 30 DAI e aos 58 DAI observou-se a maior porcentagem de severidade na testemunha (4,2%) (Figura 5B).

Figura 5 - Curva de progresso da incidência (A) e severidade (B) da ferrugem (*H. vastatrix*), em mudas de cafeeiro, nas diferentes datas de avaliação em função das doses de NPAg aplicadas. Lavras, MG, 2020.

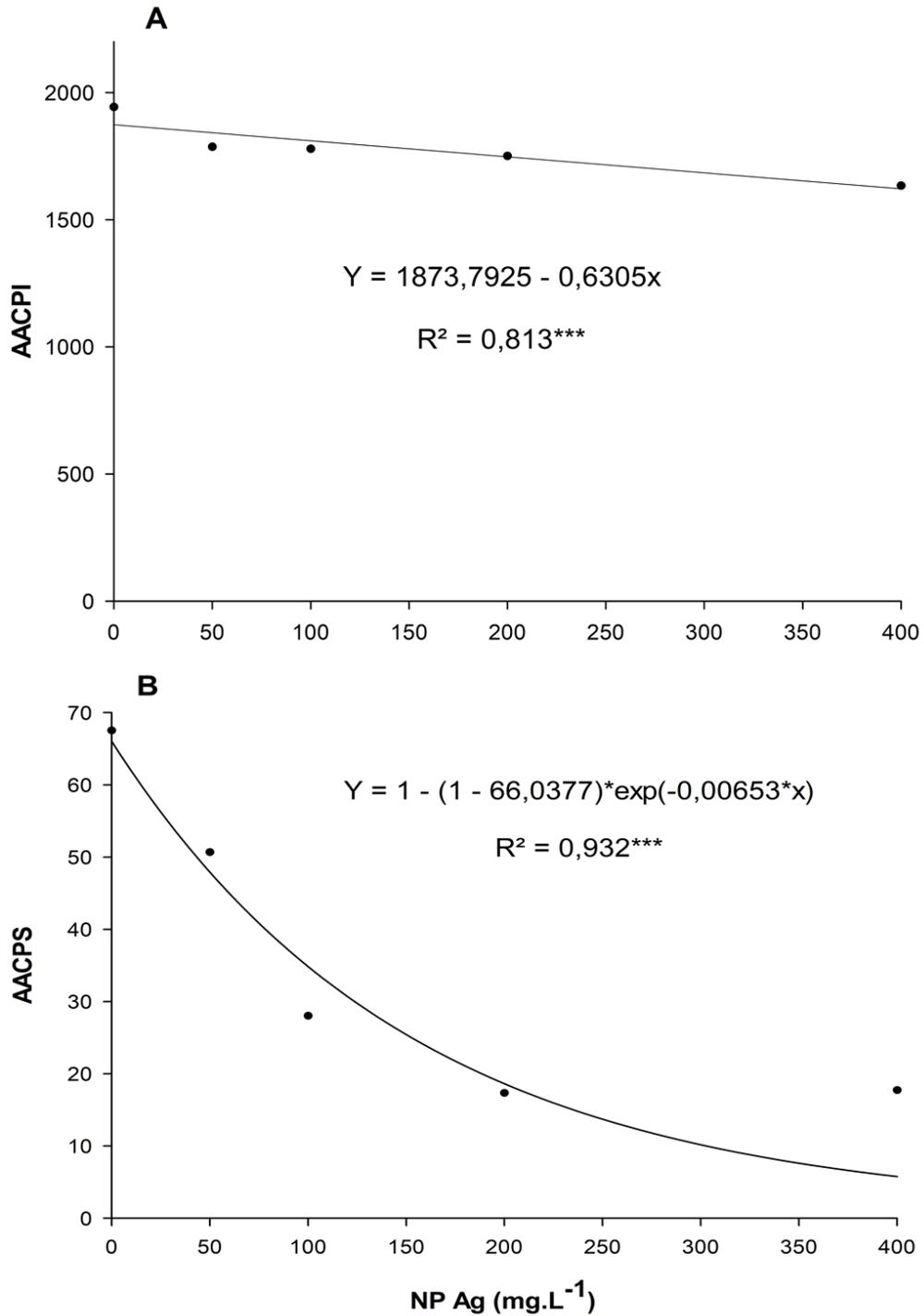


Fonte: Do autor (2020).

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) das doses de NPAG para a AACPS e a AACPI. O contraste Tratamento adicional vs Doses de NPAG apresentou interação significativa ($p < 0,05$), indicando a diferença entre as doses de NPAG e o Fungicida (Anexo A - Tabelas E, F e G).

Observou-se uma redução sutil (linear) da AACPI, ou seja, conforme o aumento das doses de NPAG maior foi o controle da doença. Na dose de 400 mg.L^{-1} a redução foi próxima de 16% em relação à testemunha Figura 6A). Para a AACPS o modelo não monomolecular proporcionou o melhor ajuste. Na dose de 50 mg.L^{-1} o controle da ferrugem foi de 25% e na de 100 mg.L^{-1} foi de 58,5%. O maior controle da ferrugem foi ocorreu mediante o uso das doses de 200 mg.L^{-1} e 400 mg.L^{-1} com 74,3% e 91,5%, respectivamente (Figura 6B).

Figura 6 - Área abaixo da curva de progresso da incidência - AACPI (A) e área abaixo da curva de progresso da severidade - AACPS (B) da ferrugem (*H. vastatrix*) do cafeeiro, em função de doses crescentes de NP Ag. Lavras, MG, 2020.



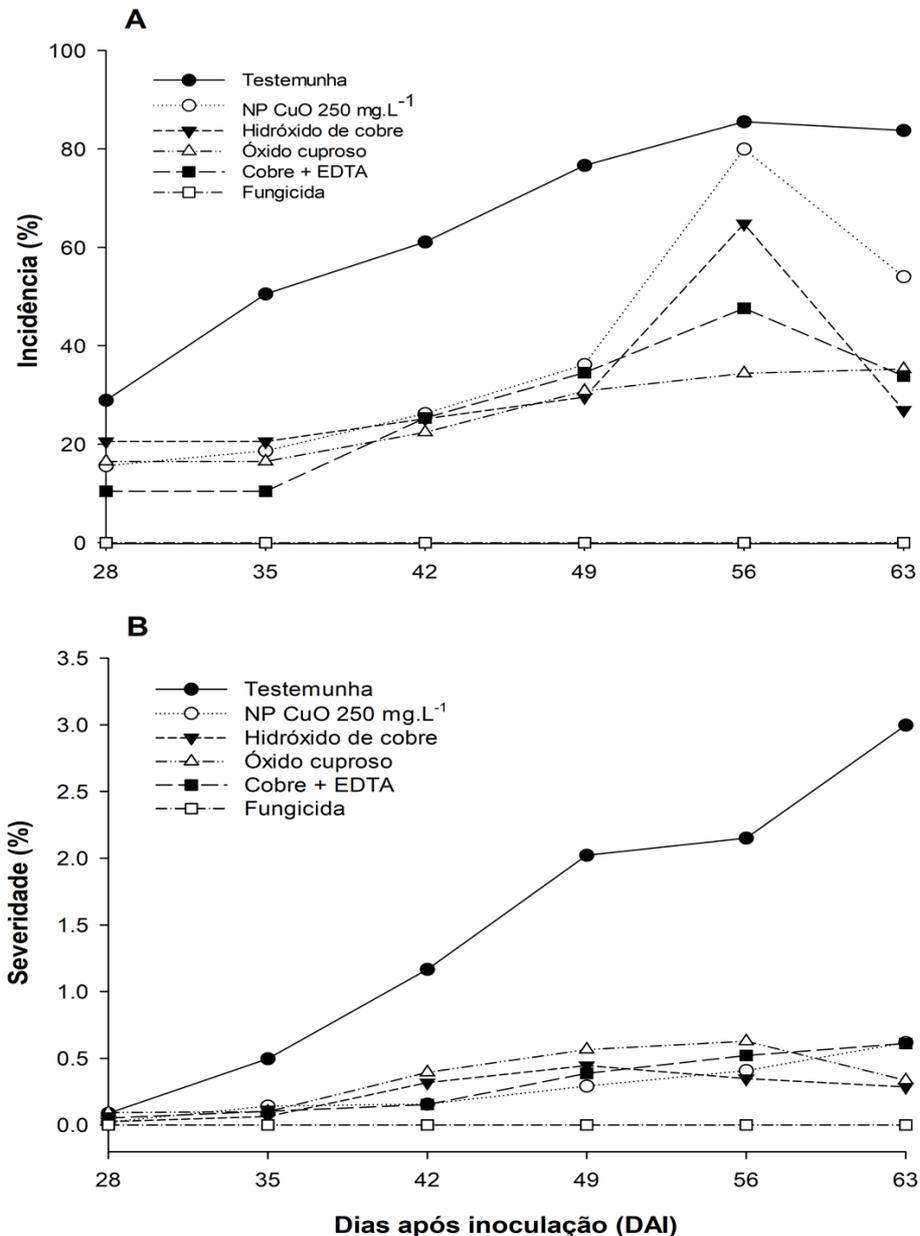
Fonte: Do autor (2020).

7.3 Experimento IV - Manejo da ferrugem (*H. vastatrix*) do cafeeiro em função de diferentes fontes de cobre aplicadas.

Houve incidência de ferrugem durante todo o período de avaliação do experimento com exceção para as mudas tratadas com o fungicida (epoxiconazol + piraclostrobina).

A menor incidência foi de 10,5% aos 28 DAI e, nas avaliações seguintes o aumento da ferrugem foi constante até atingir o valor máximo de 86% aos 56 DAI (Figura 7A). Para a severidade foram observados valores próximos a zero na primeira data de avaliação (28 DAI) e na testemunha foram observados os maiores valores de severidade, atingindo seu valor máximo aos 63 DAI (3%) (Figura 7B).

Figura 7 - Curva de progresso da incidência (A) e severidade (B) da ferrugem (*H. vastatrix*), em mudas de cafeeiro, nas diferentes datas de avaliação em função de diferentes fontes de cobre. Lavras, MG, 2020.



Fonte: Do autor (2020).

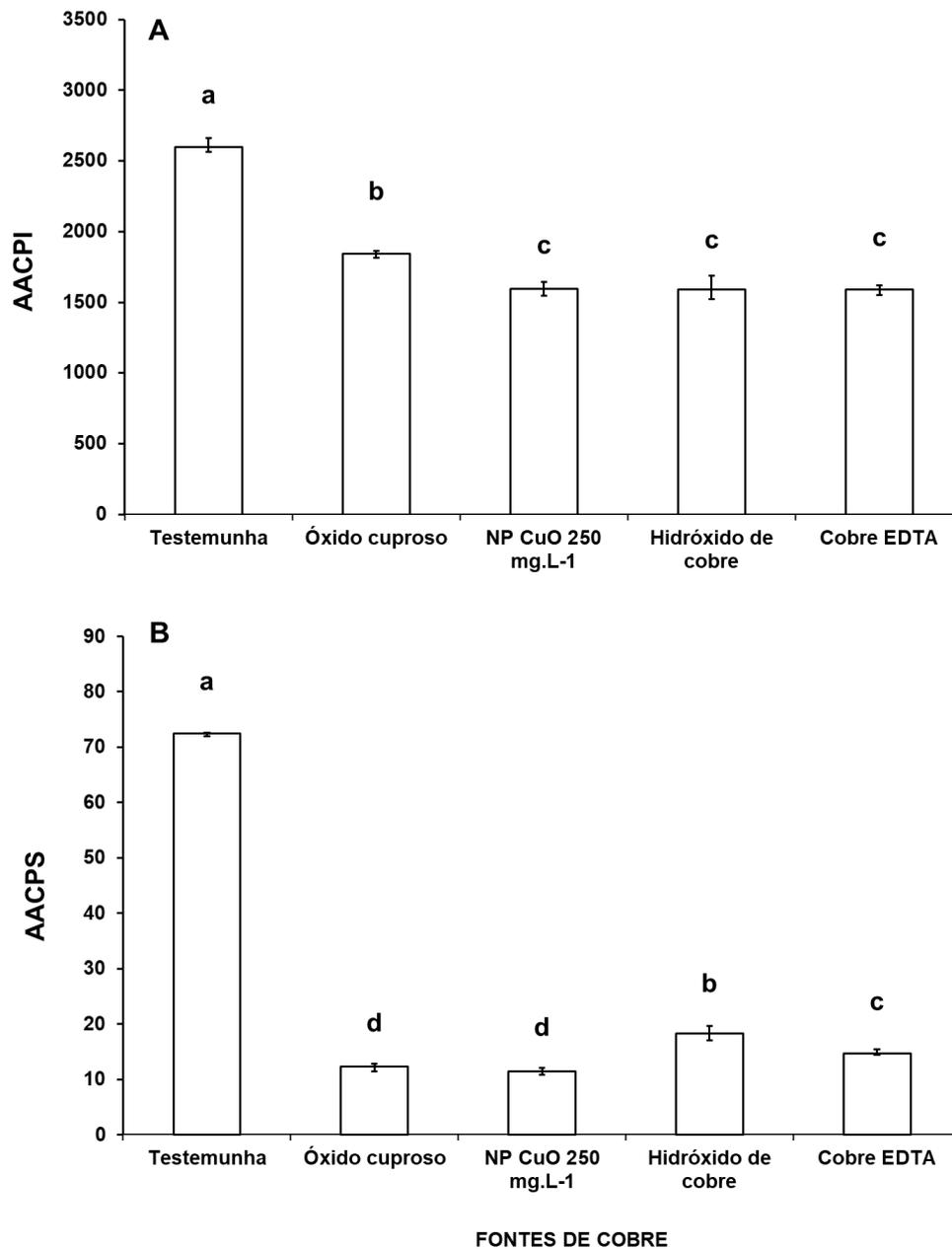
Houve efeito significativo ($p < 0,05$) das diferentes fontes de cobre para a AACPS e a AACPI. O contraste Tratamento adicional vs Fontes de Cobre realizado para as variáveis testadas apresentou interação significativa ($p < 0,05$), indicando a diferença entre as fontes de cobre e o fungicida (Anexo A - Tabelas H, I e J).

O maior valor de AACPI (2599,57) foi observado na testemunha, diferindo então das fontes de cobre ($p < 0,05$). Para a AACPI a NPCu 250 mg.L⁻¹, o hidróxido de cobre e o Cu EDTA foram semelhantes entre si ($p < 0,05$) e proporcionaram aproximadamente 39% de

controle em relação à testemunha. Essas fontes foram diferentes do óxido cuproso, pois esse promoveu somente 30% de controle da ferrugem (Figura 8A). O maior valor de AACPS (72,7) foi observado na testemunha, diferenciando-se dos demais tratamentos. O hidróxido de cobre promoveu 74,8% de controle da ferrugem, diferenciando-se das demais fontes de cobre. A NPCu 250 mg.L⁻¹ e o óxido cuproso foram semelhantes ($p < 0,05$), promovendo 84,2% e 83,1% de controle da ferrugem, respectivamente. O Cu EDTA diferiu de todas as outras fontes de cobre com 79,7% de controle da ferrugem, ou seja, foi inferior ao óxido cuproso e a NPCu 250 mg.L⁻¹, porém, o Cu EDTA foi superior ao hidróxido de cobre (Figura B).

Para o peso da parte aérea seca (PPAS) não houve interação significativa entre as fontes de cobre. Porém, observou-se efeito significativo para o contraste Tratamento adicional vs Fontes de Cobre ($p < 0,05$), sendo as fontes de cobre diferentes do Fungicida (Figura J).

Figura 8 – Área abaixo da curva de progresso da incidência - AACPI (A) e área abaixo da curva de progresso da severidade - AACPS (B) da ferrugem do cafeeiro, em função das diferentes fontes de cobre. Lavras, MG, 2020.

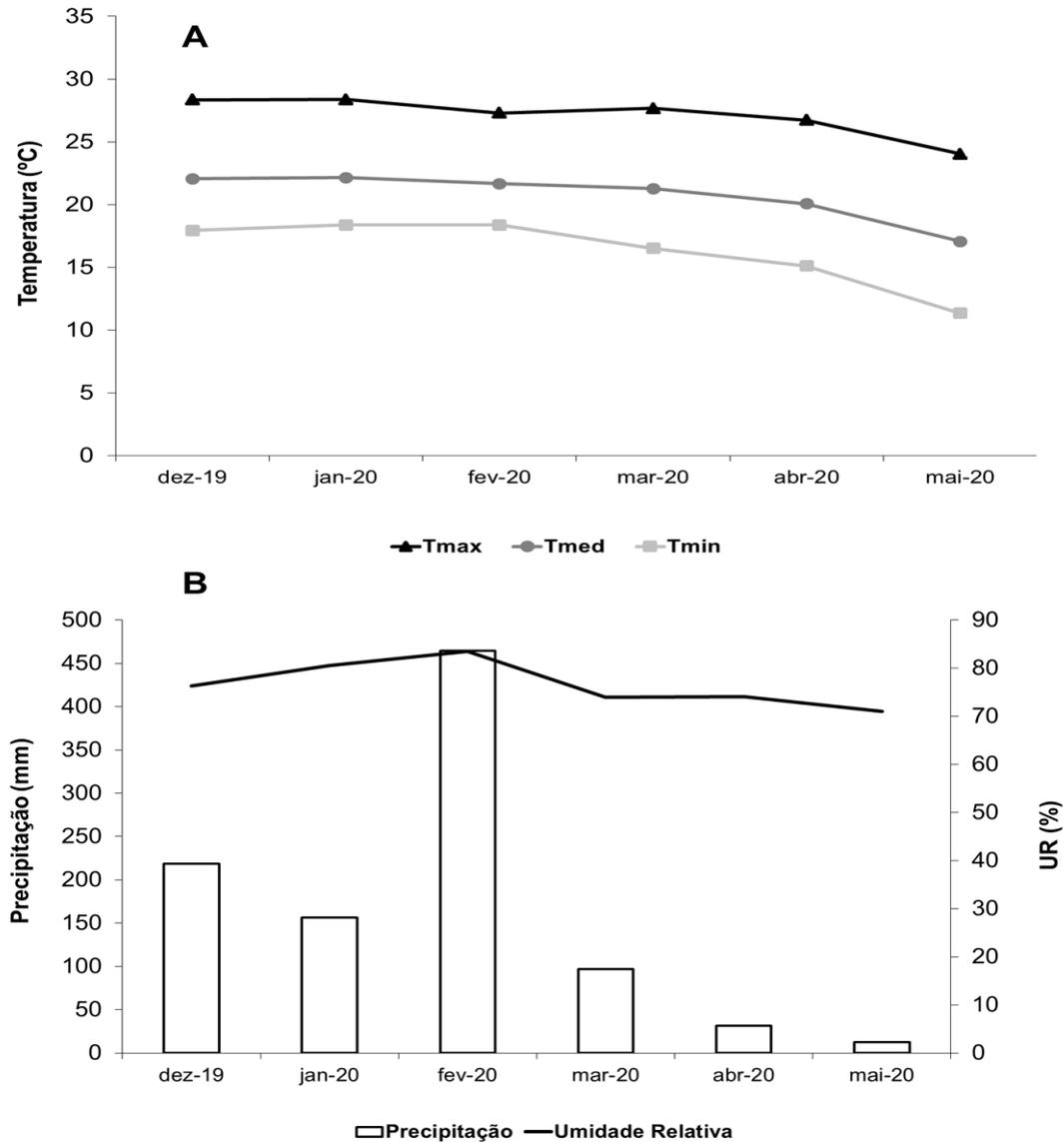


Fonte: Do autor (2020).

7.4 Experimento V - Manejo da ferrugem (*H. vastatrix*) do cafeeiro em função dos tratamentos aplicados.

As variáveis climáticas foram monitoradas durante todo o experimento. A temperatura variou entre 11,0°C e 28,0°C, com média em torno de 20,0 °C (Figura 9A) e a umidade relativa média aproximadamente 77,0%. A maior precipitação pluviométrica foi observada em fevereiro de 2020 com 465 mm (Figura 9B).

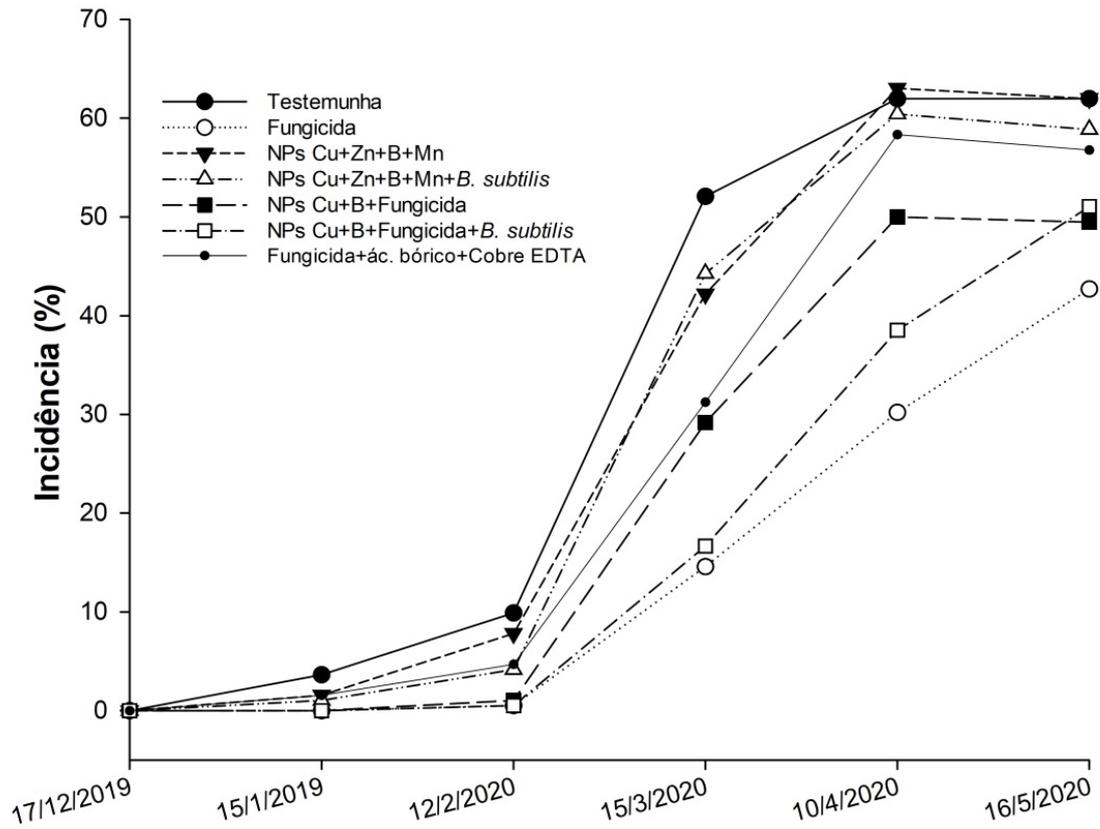
Figura 9 - Variáveis climáticas registradas no campo experimental: (A) temperatura (°C) máxima, média e mínima; (B) umidade relativa (UR%) e precipitação pluviométrica (mm). UFLA, Lavras, MG, 2019 a 2020.



Fonte: Do autor (2020).

Na primeira avaliação (dezembro/2019) não foi observada a incidência de ferrugem, mas somente a partir da segunda avaliação em janeiro/2020. Nos meses seguintes o aumento da ferrugem foi constante em todos os tratamentos. Dessa forma, em maio/2020 observou-se o maior valor de incidência para a testemunha e o tratamento NPs Cu + Zn + B + Mn, ambos com 62% de incidência. Já a menor incidência foi observada no tratamento Fungicida, em maio/2020 com apenas 43% (Figura 10).

Figura 10 - Curva de progresso da incidência da ferrugem (*H. vastatrix*) em plantas de cafeeiro, avaliadas entre dezembro de 2019 e maio de 2020. Lavras, MG, 2020.



Fonte: Do autor (2020).

Houve efeito significativo entre os tratamentos ($p < 0,05$) para a AACPI (Figuras 11) (Anexo A - Tabela K).

Os menores valores de AACPI foram observados no tratamento Fungicida, NPs Cu + B + Fungicida + *B. subtilis* e NPs Cu + B + Fungicida com 57,6%, 48,3% e 33,3% de controle da ferrugem, respectivamente. Esses tratamentos foram semelhantes entre si e diferiram dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Os tratamentos NPs Cu + Zn + B + Mn, NPs Cu + Zn + B + Mn + *B. subtilis* e Fungicida + ácido bórico + Cu EDTA não se diferenciaram significativamente da Testemunha ($p < 0,05$). Esses promoveram os menores índices de controle da ferrugem do cafeeiro com 8,9%, 11,1% e 20,5%, respectivamente.

Tabela 1 – Incidência (%) e área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI) do cafeeiro (*H. vastatrix*) nas diferentes datas de avaliações em função dos tratamentos aplicados. UFLA, Lavras, 2020.

Tratamentos	Modo de aplicação	Doses (Kg ou L.ha ⁻¹)	Avaliação da incidência da ferrugem do cafeeiro						AACPI	E(%)
			17-12-19	15-1-19	12-2-20	15-3-20	10-4-20	16-5-20		
Testemunha	--	--	0 a	3,675 a	9,925 a	52,1 a	61,97 a	62,0 a	4718,78 a	0
Fungicida	Foliar	2,0	0 a	0 b	0,525 a	14,6 b	30,2 b	42,7 a	2000,03 b	57,6156
NPs Cu+Zn+B+Mn	Foliar	0,25	0 a	1,575 b	7,825 a	42,2 a	63,02 a	61,97 a	4296,90 a	8,94035
NPs Cu+Zn+B+Mn + <i>B. subtilis</i>	Foliar	0,25 + 2,0	0 a	1,05 b	4,15 a	44,25 a	60,42 a	58,85 a	4195,35 a	11,0924
NPs Cu+B + Fungicida	Foliar	0,25 + 2,0	0 a	0 b	1,05 a	29,175 b	50 a	49,47 a	3148,45 b	33,2782
NPs Cu+B + Fungicida + <i>B. subtilis</i>	Foliar	0,25 + 2,0 + 2,0	0 a	0 b	0,525 a	16,675 b	38,55 a	51,05 a	2437,53 b	48,3441
Fungicida + ácido bórico + Cu EDTA	Foliar	2,0 + 0,15 + 0,5	0 a	1,575 b	4,7 a	31,25 b	58,32 a	56,77 a	3750,03 a	20,5297
Coeficiente de Variação (%)			0	109,7	113,6	45,9	31,9	22,9	33,30	--
Média			0	1,125	4,608	32,893	51,786	54,689	3506,721	--

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas colunas de acordo com o teste de Scott-Knott (p<0,05).

Fonte: Do autor (2020).

8 DISCUSSÃO

No presente trabalho verificou-se a eficiência das nanopartículas metálicas (Ag e Cu) para controlar a ferrugem do cafeeiro com destaque para a nanopartícula de cobre, devido ao fato do cobre já ser amplamente empregado no controle de diversas doenças de plantas. No entanto, para alcançar níveis satisfatórios de controle são necessárias altas doses de cobre metálico ($<1000 \text{ mg.L}^{-1}$). Diferente disso, a nanopartícula de cobre pode ser utilizada em baixas doses ($>500 \text{ mg.L}^{-1}$).

A atividade microbiana das nanopartículas de cobre e prata pode estar relacionada aos danos causados à integridade da parede celular dos microrganismos (DINESH et al., 2012) e como consequência, há o extravasamento de compostos intracelulares e a morte celular. As nanopartículas podem ter mecanismos de ação distintos, como íons tóxicos ligados às proteínas na sua estrutura, isso leva ao seu acúmulo e impede a atuação correta na membrana, afetando a permeabilidade celular do patógeno (LEMIRE et al., 2013; ALGHUTHAYMI et al., 2015). Outra hipótese está relacionada à ativação de respostas de defesas das plantas, promovidas por nanopartículas de prata e cobre (ELMER; MA; WHITE, 2018).

No presente trabalho o Cu e a Ag foram utilizados em suas formas nanoparticuladas, com o objetivo de reduzir a intensidade da principal doença do cafeeiro, a ferrugem. Em trabalho realizado por Mendes et al. (2014), foi avaliado o efeito *in vitro* da NP_{Ag} no controle de *Phomopsis* sp. em sementes de soja, como resultado os autores constataram 90% de inibição na dose de 180 mg.L^{-1} e inibição absoluta nas doses de 270 e 540 mg.L^{-1} . Esses resultados evidenciam a efetividade da NP_{Ag} em baixas concentrações e vão de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho, pois no experimento *in vitro* a dose de 50 mg.L^{-1} da NP_{Ag} inibiu a germinação dos esporos em 77%, com o aumento das doses houve também maior redução da germinação e na maior dose (400 mg.L^{-1}) a inibição foi de 100%. Para as doses intermediárias (100 e 200 mg.L^{-1}) a redução foi de 96,4% e 98,9,0%, respectivamente. O comportamento da NP_{Cu} foi semelhante, a menor dose (50 mg.L^{-1}) foi capaz de inibir 74,7% da geminação dos esporos de *H. vastatrix*. Como mencionado, a germinação reduziu com o aumento das doses, sendo 75,5%, 80,9% e 85% para as doses de 100 mg.L^{-1} , 200 mg.L^{-1} e 400 mg.L^{-1} , respectivamente.

Os altos valores de controle promovidos por NP_{Ag} são justificáveis, pois essas são extremamente reativas devido a sua alta capacidade de gerar íons Ag^+ e possuírem alta afinidade com as cargas negativas das membranas dos microrganismos. Além disso, as

nanopartículas são eficientes em penetrar nas células microbianas. Sendo assim, esses fatos justificam o seu uso em baixas concentrações, pois o controle microbiano é realizado por meio de interrupções nos sistemas de transporte, incluindo o efluxo de íons (MORONES et al., 2005; KIM et al., 2009; KRISHNARAJ et al., 2012). A interrupção do efluxo iônico pode causar rápido acúmulo de íons de Ag e pode interferir no processo celular como o metabolismo e a respiração, reagindo com moléculas (LAMSAL et al. 2011). Além disso, os íons de Ag podem produzir espécies reativas de oxigênio prejudiciais às células, causando danos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (MORONES et al 2005).

As nanopartículas de Ag são promissores agentes antimicrobianos e o seu uso no manejo de doenças de plantas possui grande potencial. As nanopartículas de Ag foram as primeiras a serem pesquisadas no manejo de doenças de plantas (PARK et al., 2006), em razão da alta atividade antimicrobiana da Ag já conhecida (ELMER et al., 2018).

Kim et al. (2008) estudaram o efeito antifúngico da solução de NPAg (1,5 nm) em rosas contra o oídio (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*), essa nanopartícula apresentou alta dispersão e estabilidade. A solução de NPAg na concentração de 10 mg.L⁻¹ foi aplicada na rosas com oídio e após dois dias, observou-se redução de aproximadamente 95%. A ocorrência do oídio nessas mesmas rosas foi observada somente uma semana após a aplicação. De acordo com os autores, as plantas não apresentaram sintomas de fitotoxicidade. Min et al. (2009) utilizaram NPAg (4 - 8 nm) como alternativa aos fungicidas convencionais para o controle de fungos fitopatogênicos formadores de escleródios e, as hifas expostas à NPAg foram severamente danificadas, resultando na separação de camadas da parede e no colapso das hifas. Os autores constataram o maior controle desses fungos em comparação à Ag na forma macroscópica. O uso de baixas doses também é defendido por outros autores, pois mesmo em sua forma iônica a Ag em baixa concentração é altamente tóxica aos microrganismos (MOUSSA et al., 2013). No entanto, o modo de ação da NPAg ainda não foi completamente decifrado em relação aos fungos fitopatogênicos (KIM et al., 2009) e em razão disso, distintos estudos são desenvolvidos para investigar o controle de patógenos por meio das nanopartículas de prata (DURÁN et al., 2018).

Sabe-se que as nanopartículas com tamanho elevado podem se aglutinar e precipitar. Esse fato pode interferir na relação efetiva de controle entre as nanopartículas e os patógenos (ADAMS et al., 2006). Por essa razão, destaca-se a viabilidade da redução das doses de cobre utilizadas no controle de doenças de plantas.

Nos experimentos II e III, a redução da ferrugem foi verificada já na dose de 50 mg.L⁻¹ e aumentou até a dose de 400 mg.L⁻¹. Por essa razão, destaca-se a viabilidade da redução das doses de cobre utilizadas na cafeicultura, nesse sentido desempenho semelhante foi obtido em trabalhos anteriores nessa faixa de dosagem. Em comparação ao fungicida cúprico registrado para a requeima da batata (*Phytophthora infestans*), nanopartículas de CuO, Cu₂O e Cu/Cu₂O foram eficientes no controle da doença quando a NPCu foi aplicada em doses entre 150 e 340 mg.L⁻¹ (GIANNOUSI et al., 2013).

Em melancia, *nanosheets* (nanoestrutura bidimensional) de Cu₃(PO₄)₂-3H₂O a 10 mg.L⁻¹ suprimiram significativamente a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*), com decréscimo de 58% no progresso da doença. Com o uso de NPCu os efeitos na redução da doença foram significativos apenas a 1000 mg.L⁻¹ (BORGATTA et al., 2018). Esses resultados são diferentes dos observados no presente trabalho, pois efeitos significativos no controle da ferrugem foram obtidos com a dose de 50 mg.L⁻¹ de NPCu, ou seja, uma dose 20 vezes menor. A dose de 50 mg.L⁻¹ da NPCu proporcionou a redução da AACPS da ferrugem em 37%, a maior redução foi observada nas doses de 200 mg.L⁻¹ e 400 mg.L⁻¹, perfazendo 84,4% e 97,5% de controle, respectivamente

Os resultados obtidos para a ferrugem do cafeeiro se assemelham à resultados observados em outros patossistemas.. Por exemplo, Hao et al. (2019) avaliaram em roseiras a inibição de *Podosphaera pannosa* em função da aplicação de NPCu e não visualizaram nenhuma colônia de *P. pannosa* nas folhas expostas às diferentes concentrações de NPCu, 19 dias após a aplicação. A NPCu na dose de 50 mg.L⁻¹ reduziu o crescimento do patógeno em 40%, já na dose de 200 mg.L⁻¹ a redução foi de 100%.

A atividade da NPCu contra patógenos pode ocorrer de maneira distinta em preparações com meio de cultura e com água (ADAMS et al., 2006; HRENOVIC et al., 2012). Além disso, a composição, a forma das nanopartículas e as diferenças associadas na taxa de liberação de Cu²⁺ podem interferir nos seus efeitos benéficos (BORGATTA et al., 2018). De acordo com Strayer-Scherer et al. (2018), nanopartículas de cobre são capazes de liberar maiores quantidades de íons ativos de Cu²⁺ e maior efetividade para penetrar nas membranas dos patógenos, em comparação ao Cu com partículas macroscópicas.

A efetividade da NPCu no controle da ferrugem do cafeeiro constatada nesse trabalho deve-se ao fato do Cu afetar a membrana plasmática, inibir a multiplicação celular dos patógenos e atuar como agente fungistático (ORDAX et al., 2006; MAHAPATRA et al., 2008; RUPARELIA et al., 2008). Os óxidos cúpricos e cuprosos causam inativação de

proteínas, danos ao DNA e perda da integridade da membrana. Tudo isso, aliada às características peculiares da nanopartícula possivelmente garantiu a maior uniformidade da distribuição de cobre na superfície das folhas, aumento do contato das partículas de cobre com os uredosporos de *H. vastatrix* e também a maior liberação de Cu^{2+} . Além disso, para a maior eficácia no controle de fungos e bactérias, a distribuição do cobre na superfície das folhas deve ser uniforme (GISI; SIEROTZKI, 2008).

Com o estudo das nanopartículas metálicas no controle da ferrugem do cafeeiro, foi possível inferir sobre a influência do tempo de aplicação das nanopartículas em comparação ao momento de inoculação do patógeno. No presente trabalho, essas foram aplicadas nas mudas de cafeeiro sete (7) dias antes da inoculação com *H. vastatrix*. Essa relação entre o momento de aplicação da NP e a inoculação do patógeno foi estudada por Lamsal et al. (2011a), os autores compararam quatro concentrações de NP_{Ag} (10, 30, 50 e 100 mg.L^{-1}) e dois fungicidas comerciais como controle positivo e, como controle negativo a água destilada. Os tratamentos foram aplicados nas plantas em dois momentos distintos e foram utilizados dois grupos de plantas, aquele onde os tratamentos foram aplicados antes da inoculação do patógeno e o grupo de plantas onde a aplicação ocorreu após a inoculação. Os autores constataram a eficiência da NP_{Ag} na supressão de oídio em pepino e também observaram diferença no nível de incidência em relação ao momento de aplicação da nanopartícula, antes ou após a inoculação. A incidência reduziu conforme o aumento das concentrações, sendo 57,8%, 48,8%, 40,2% e 20% nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 mg.L^{-1} de NP_{Ag} aplicadas após a ocorrência da doença. De maneira semelhante houve redução da incidência em 45%, 40%, 27% e 18% nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 mg.L^{-1} de NP_{Ag} aplicadas antes da inoculação do patógeno nas plantas, respectivamente. No entanto, a menor incidência foi proporcionada quando a aplicação foi realizada antes da ocorrência da doença, em ambas as concentrações.

Sejam as nanopartículas de Ag ou de Cu, foi possível verificar o controle da ferrugem em todas as doses, mas em diferentes níveis. No experimento IV, a dose de 250 mg.L^{-1} de NPCu foi comparada à outras fontes de cobre registradas para o cafeeiro e recomendadas em altas concentrações, como é o caso do hidróxido de cobre com recomendação de até 2500 mg.L^{-1} . A dose de 250 mg.L^{-1} da NPCu promoveu a redução de 84,2% da AACPS, enquanto o hidróxido de cobre com uma concentração dez vezes maior foi inferior à NPCu em 10%. Esses resultados positivos das nanopartículas fortalecem a busca por aplicações de fungicidas sistêmicos e de contato em menores concentrações para controlar as doenças de plantas.

Muitos são os estudos sobre a eficiência de baixas concentrações de nanopartículas. Em razão disso, isolados de diferentes espécies de *Colletotrichum* foram tratados com NPAg em diferentes concentrações, na concentração de 100 mg L⁻¹ o crescimento micelial dos isolados C3 e C5 foi completamente inibido. E nos isolados C7 e C8 a inibição chegou a 90% (LAMSAL et al., 2011b). Kumari et al., (2017) estudaram o papel das nanopartículas contra *Alternaria solani* em tomate, utilizaram as nanopartículas de prata sintetizadas em células de *Trichoderma viride* (MTCC 5661), os autores observaram *in vitro* a redução de 100% na contagem de esporos após o 3º dia de tratamento e redução de 73,3% na biomassa fúngica após o 7º dia de tratamento. Em plantas, houve aumento significativo de 32,6% no peso de planta fresca quando as plantas infectadas por *Alternaria solani* foram tratadas com NPAg em comparação as não tratadas. Doses com 50 e 100 mg L⁻¹ de NPAg inibiram significativamente a formação de colônias de *Magnaporthe grisea* e *Bipolaris sorokiniana*, respectivamente. Já em plantas de azevém (*Lolium perene* L.) a severidade das doenças causadas por esses patógenos foi reduzida a menos de 7%. Nas plantas controle (aplicação de água) a severidade foi superior a 70% (JO et al., 2009).

No experimento V, as nanopartículas de Cu, Zn, B e Mn foram empregadas no manejo da ferrugem em condições de campo, na dose de 200 mg L⁻¹, seja em associação com fungicidas registrados para cultura ou somente a aplicação das nanopartículas. Nas condições em que o experimento foi realizado, as NPs de Cu e B associadas ao Fungicida (azoxistrobina + mancozebe + ciproconazol) foram eficientes e promoveram controle semelhante ao observado nas plantas tratadas somente com o Fungicida. De modo semelhante, ocorreu quando as NPs de Cu e B foram associadas ao Fungicida (azoxistrobina + mancozebe + ciproconazol) e ao *Bacillus subtilis*. Com isso, destaca-se a possibilidade das NPs serem aplicadas em conjunto com fungicidas biológicos, sistêmicos e/ou de contato.

No entanto, a aplicação isolada das NPs não promoveu a redução significativa da ferrugem e alguns fatores podem ter contribuído para essa ineficiência das NPs, como por exemplo, a dose usada (200 mg L⁻¹) não foi suficiente para controlar a ferrugem em condições de campo, pois a concentração de cobre depositado sobre a folha da planta é muito importante. Segundo Paula (2018), no momento da aplicação de qualquer agroquímico pode ocorrer à perda por deriva e não atingir o alvo. Ainda segundo o autor, o adjuvante adicionado às caldas também pode ter influenciado o efeito das NPs, devido a sua capacidade de melhorar o espalhamento das gotas, como aumentar a retenção, absorção e penetração dos ingredientes ativos (CUNHA; ALVES; MARQUES, 2017). Ou seja, a absorção da NP no

tecido foliar provavelmente foi favorecida e aumentada, em razão de sua pequena dimensão. Como consequência, houve a redução da quantidade de NPs na superfície da folha, favorecendo o menor contato do fungo com as NPs e isso possibilitou a germinação e penetração do fungo.

As nanopartículas são consideradas como uma abordagem nova, porém, essas já desempenham importante papel no manejo de doenças de plantas e importantes resultados foram alcançados *in vitro*, em casa de vegetação e em campo. As nanopartículas são benéficas para a proteção das plantas contra patógenos e alguns métodos já foram utilizados para demonstrar a função das nanopartículas de Ag, Cu, Si, Ti e Zn no sistema de defesa da planta (ELMER; WHITE, 2016). Nesse aspecto, o futuro das nanopartículas como alternativa para o manejo de doenças é promissor (KHAN; RIZVI, 2014) e conforme a tecnologia avança, o seu uso na Fitopatologia é impulsionado (JO et al., 2009).

A partir da realização desse trabalho, foi possível averiguar o grande potencial das nanopartículas metálicas para controlar a ferrugem do cafeeiro em doses inferiores a 500 mg.L⁻¹. Os resultados são extremamente promissores para a cafeicultura, principalmente no que se refere à sustentabilidade das lavouras. Nesse sentido, e em consonância com as diretrizes e normas dos órgãos reguladores e cada vez mais exigentes por sistemas de produção ambientalmente seguros e com menor risco a saúde humana, a redução dos volumes de agroquímicos aplicados é um dos principais fatores para alcançar a sustentabilidade, e nesse contexto, o uso de nanopartículas é extremamente viável.

9 CONCLUSÕES

As nanopartículas de Cu e Ag foram eficientes em reduzir a germinação dos esporos de *H. vastatrix*.

As nanopartículas de Cu e Ag controlaram a ferrugem nas mudas de café em casa de vegetação.

Em relação a outras fontes de cobre, a NPCu foi viável ao ser comparada com a quantidade de cobre metálico necessário para reduzir a ferrugem. Portanto, 250 mg.L⁻¹ de cobre metálico fornecido via NPCu foi capaz de promover a redução de 84,2%, enquanto 2500 mg.L⁻¹ oriundo do hidróxido de cobre resultou em 75% de redução, ou seja, uma diferença de aproximadamente 10% a mais de controle da NPCu.

No campo as NPs de Cu e B foram eficientes quando associadas aos fungicidas (azoxistrobina + mancozebe + ciproconazol) e aos agentes de controle biológico (*Bacillus subtilis*) isoladamente ou quando misturados.

A ferrugem do cafeeiro assume papel importante entre os fatores causadores de perdas na cafeicultura, o seu manejo deve ser realizado de maneira racional e sustentável, com a alternância de princípios ativos dos fungicidas e a aplicação no momento correto. Nesse cenário, a nanotecnologia surge como uma alternativa a ser inserida nas estratégias de manejo integrado da doença. Contudo, os estudos sobre a aplicação de nanopartículas na cafeicultura devem ser realizados, a fim de entender a melhor maneira de empregá-las.

Os estudos devem ser intensificados em condições de campo para investigar as melhores concentrações, possíveis combinações com outros fungicidas registrados e o momento adequado das aplicações para o controle da ferrugem. Como também monitorar a contribuição das nanopartículas para a nutrição do cafeeiro.

REFERÊNCIAS

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2010). **Cartilha sobre Nanotecnologia**. Brasília: MDCI; Campinas: UNICAMP, 2010.

ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**. Elsevier: v. 40, ed. 19, p. 3527 – 3532, nov. 2006.

ALGHUTHAYMI, M. A.; ALMOAMMAR, H.; RAI, M.; SAID-GALIEV, E.; ABD-ELSALAM, K. A. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v. 29, p. 221-236, 2015.

ALMEIDA, S. R. Doenças do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p.391-399.

ARCADIS – Design & Consultancy for natural and built assels. EU REACH requirements for nanomaterials - more efforts needed. 2020. Disponível em: <<https://www.arcadis.com/en/europe/arcadis-blog/nele-deleebeeck/eu-reach-requirements-for-nanomaterials/>>. Acesso em: 18 de agosto de 2020.

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, p. 303 – 321, 2015.

BEHLAU, F. et al. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 94, p. 185–191, 2017.

BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; MENEZIES, J.G. Mineral nutrition in the management of plant diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n.4, p. 402-412, Apr. 2003.

BOLDINI, J. M. **Epidemiologia da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro irrigado e fertirrigado**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

BORGATTA, J. et al. Copper based nanomaterials suppress root fungal disease in watermelon (*Citrullus lanatus*): role of particle morphology, composition and dissolution behavior. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6 (11), p. 14847-14856, 2018.

BROADLEY, M. et al. Function of nutrientes: micronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed). **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Elsevier. 3 ed., p. 206 – 212. London, 2012.

CABÚS, A. et al. Efficacy of reduced copper dosages against *Plasmopara viticola* in organic agriculture. **Crop Protection**, v. 96, p. 103-108, 2017.

CARVALHO, C. A. **Uso de nanopartículas no controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2019. 41 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, MG. 2019.

CARVALHO, J. G.; GUIMARÃES, R. J.; BASTOS, A. R. R. et al. Sintomas de desordens nutricionais injúrias em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitários e fisiológicos**. Lavras: UFLA, p. 29-66, 2010.

CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativa de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**. Lavras, v.7, n.1, p.42-49, jan./abr. 2012.

CDA. COPPER DEVELOPMENT ASSOCIATION INC. **A timeline of copper technologies**. USA, 2020. Disponível em: <<https://www.copper.org/education/history/timeline/timeline.html>>. Acesso em: 10 de novembro de 2020.

CHALFOUN, S.M. Aspectos da utilização de fungicidas cúpricos na cultura do cafeeiro: revisão de literatura. 2. ed. Lavras: Griffin, p. 88, 1999.

COLARES, M. R. **Modelagem de perdas de produtividade do cafeeiro relacionada à ferrugem**. 2018. 87 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, MG. 2018.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade do solo - Valores orientadores para solo e água subterrânea, 2020**. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/solo/valores-orientadores-para-solo-e-agua-subterranea/>>. Acesso em: 01 de junho de 2020.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acomp. safra brasileira de café**. v. 6– Safra 2020, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-62, janeiro de 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 05 de abril de 2019.

COPAM. CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL. **Deliberação Normativa COPAM nº 166, de 29 de junho de 2011**. Altera o Anexo I da Deliberação Normativa Conjunta COPAM CERH nº 2 de 6 de setembro de 2010, estabelecendo os Valores de Referência de Qualidade dos Solos. Diário do Executivo, Belo Horizonte, 27 jul. 2011.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, SEMA. 2005.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial da União, Brasília, n. 249, p. 81-84, 30 dez. 2009.

CONSOLINI, G. **Síntese e atividade microbiana de nanopartículas metálicas**. 2015. 23 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas – Campus de Poços de Caldas, MG. 2015.

COUTO, G. G. do. **Nanopartículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono**. 2006. 151 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2006.

COUTTOLENC-BRENIS, E. et al., Prehaustorial local resistance to coffee leaf rust in a Mexican cultivar involves expression of salicylic acid-responsive genes. **PeerJ**, v. 8:e8345, p. 1 – 21, 2020.

CRUZ FILHO, J.; CHAVES, G. M. Efeito da adubação NPK e micronutrientes (FTE) na incidência da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk and Br). In: **Congresso brasileiro sobre pragas e doenças do cafeeiro**. v. 1, p. 60-61. Vitória. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC-GERCA. 1973.

CUNHA, R. L. et al. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para avaliar a severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL**, 2., 2001, Vitória. Resumos. Vitória: Embrapa Café. p. 1101-1108, 2001.

CUNHA, R. L. **Controle químico de doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) como parte do programa APPCC**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Lavras, Lavras, MG. 2003.

CUNHA, R. L. da; MENDES, A. N. G.; CHALFOUN, S. M. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 990-996, set./out. 2004.

CUNHA, J. P. A. R.; ALVES, G. S.; MARQUES, R. S. Tensão superficial, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica de caldas de produtos fitossanitários e adjuvantes. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 261-270, abr-jun, 2017.

DE LIMA, R; SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v.32, ed.11, p. 867-879, 2012.

DINESH, R. et al. Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. **Geoderma**. Elsevier: v. 173-174, p. 19-27, 2012.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine**, v. 12, ed. 3, p. 789-799, 2016.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. XV, n. 00, p. 1-8, 2018.

ELMER, W.; MA, C.; WHITE, J. C. Nanoparticles for plant disease management. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v, p. 66-70. December 2018.

ELMER, W.; WHITE, J. C. The Future of Nanotechnology in Plant Pathology. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 56, p. 01-33. 2018.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Regulation (EU) 2018/1881 of 3 December 2018 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annexes I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI, and XII to address nanoforms of substances. **Official Journal of the European Union**, L 308, p. 1 – 20. Disponível em: <https://eur->

lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1881&from=EN. Acesso em: 18 de maio de 2020.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1981 of 13 December 2018 renewing the approval of the active substances copper compounds, as candidates for substitution, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) N° 540/2011. **Official Journal of the European Union**, L 317, p. 16 – 20. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1981&from=PT>>. Acesso em: 18 de maio de 2020.

EUROPEAN UNION (EU). DIRECTIVE 2009/128/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. **Official Journal of the European Union**, L 309, p. 71 – 84. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:en:PDF>>. Acesso em: 18 de maio de 2020.

EVANS, I.; SOLBERG, E.; HUBER, D. M. Copper and Plant Disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. (Eds.). **Mineral Nutrition and Plant Disease**. USA: The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 177-188, 2007.

FERNANDES, J. C., HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. **Botanical Review**, v. 57, p. 246 – 273, 1991.

FERNANDES, L. H.; RESENDE, M. L.; PEREIRA, R. B.; COSTA, B. H.; MONTEIRO, A. C.; JUNIOR, P. M. Acidobenzolar-s-metil no controle da ferrugem e da cercosporiose do cafeeiro em condições de campo. **Coffee Science**, v.8, n. 1, p. 24- 32.2013.

FERREIRA, M. A. M.; FILIPE, J. A.; COELHO, M.; CHAVAGLIA, J. Nanotechnology applications in industry and medicine. **Acta Scientiae et Intellectus**, v. 3 (2), p. 31-50, 2017.

GIANNOUSI, K.; AVRAMIDIS, I.; DENDRINOUS-SAMARA, C. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nano-particles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. **RSC Advances**, v. 3 p.21743–21752, 2013.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**. Springer, v. 122, p. 157–167, 2008.

GONTIJO, R. A. N. et al. Faixas críticas de teores foliares de micronutrientes em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 135-141, jul./dez. 2007.

GRAHAM, J. H. et al. Potential of Nano-Formulated Zinc Oxide for Control of Citrus Canker on Grapefruit Trees. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p.2442-2447, 2016.

GUIMARÃES, S. E. et al. Indutores de resistência no controle da cercosporiose do cafeeiro: análise de genes relacionados à defesa. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 308-317, jul./set. 2016.

- HAO, Y. et al. Engineered nanomaterials inhibit *Podospaera pannosa* infection on rose leaves by regulating phytohormones. **Environmental Research**, v. 170, p. 1 - 6, 2019.
- HASSAN, S. E. D. et al. New approach for antimicrobial activity and bio-control of various pathogens by biosynthesized copper nanoparticles using endophytic actinomycetes. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 11, p. 262-270, 2018.
- HRENOVIC, J. et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles supported onto natural clinoptilolite. **Chemosphere**. Elsevier: v. 88, ed. 9, p. 1103 – 1107 August 2012.
- HUBER, D.; ROMHELD, V.; WEINMANN, M. Relationship between nutrition, plant disease and pests. In: MARSCHNER, P. (Ed). **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Elsevier. 3. ed., p. 283 – 298. London, 2012.
- ICO. INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Relatório sobre o mercado do café - dezembro de 2019**. London: ICO, 2019. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2019-20/cmr-1219-p.pdf>>. Acesso em: 06 de outubro de 2020.
- ICO. INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Relatório sobre o mercado do café – setembro de 2020**. London: ICO, 2020. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2019-20/cmr-0920-p.pdf>>. Acesso em: 06 de outubro de 2020.
- JO, Y. K.; KIM, B. H.; JUNG, G.. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Disease**, v. 93, p. 1037-1043, 2009.
- KHAN, M. R., RIZVI, T. F. Nanotechnology: Scope and application in plant disease management. **Plant Pathology Journal**, v.13, n.3, p.214-231, 2014.
- KIM, H.; KANG, H.; CHU, G.;BYUN, H. Antifungal effectiveness of nanosilver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. *Solid State Phenomena*, vol. 135, p. 15 – 18, 2008.
- KIM, S. W. et al. An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. **J. Microbiol Biotechnol**. v. 19, p. 760-764, 2009.
- KOPSELL, D. E.; KOPSELL, D. A. Copper. In: BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. (eds) *Handbook of plant nutrition*. Boca Raton, **Taylor and Francis Group**, p. 293–328, 2007.
- KRISHNARAJ, C. et al. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.93, 95–99, 2012.
- KUMARI, M. et al.. Protective role of biosynthesized silver nanoparticles against early blight disease in *Solanum lycopersicum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 121, p. 216-225, 2017.
- KUSHALAPPA, A. C.; ESKES, A. B. Advances in coffee rust research. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 503-531, Sept. 1989.

- LAMICHHANE, J. R. et al. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. **A review. Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, ed. 3, n. 28, p. 1-18, 2018.
- LAMSAL, K. et al. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. **Mycobiology**, v. 39, ed. 3, p. 26–32, 2011a.
- LAMSAL, K. et al. Application of silver nanoparticles for the control of colletotrichum species in vitro and pepper anthracnose disease in field. **Mycobiology**, v. 39, ed. 3, p. 194-199, 2011b.
- LEAL, F. D. S. et al. Desenvolvimento e criação de novos fungicidas. In: POZZA, E. A. et al. (Eds). **Plant health in tropical agribusiness: the numbers of the giant**. Lavras: UFLA, p. 28 – 49. Novembro, 2019.
- LA TORRE, A.; IOVINCO, V.; CARADONIA, F. Copper in plant protection: current situation and prospects. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 57, n. 2, p. 201–236, 2018.
- LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat. Ver. Microbiol.** v.11, p. 371384, 2013.
- LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (npsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina**. 2017. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2017.
- MAGDALANE, C. M. et al. Photocatalytic activity of binary metal oxide nanocomposites of CeO₂/CdO nanospheres: investigation of optical and antimicrobial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.163, p.77-86, 2016.
- MAHAPATRA, O. et al. Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. **Journal of Experimental Nanoscience**. Taylor & Francis, vol. 3, n. 3, p. 185 – 193, September 2008.
- MALAVOLTA, E.; VITTI G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações. POTAFOS. Piracicaba. Brasil, p. 329, 1997.
- MARTINS, S. C. **Adsorção e dessorção de cobre em solos sobre aplicação de lodo de esgoto e calda bordalesa**. 2005. 99 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MATSUMOTO, S. N. et al. Initial growth of coffee plants (*Coffea arabica* L.) submitted to different phosphate doses in nutritive solution. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 58-67, jan./jun. 2008.
- MCCOOK, S.; VANDERMEEN, J. The big rust and the red queen: Long-term perspectives on coffee rust research. **Phytopathology**. v. 105, p. 1164–1173. 2015.
- MENDES, J. E. et al. Antifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopathogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, vol. 8, n. 9, 20014.

- MIN, J.S. et al. Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. **Plant Pathology**, v.25, n.4, p.376-380, 2009.
- MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, ed. 1ª, r.5ª, p. 142 – 177, 2013.
- MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, vol. 16, n. 10, p. 2346 – 2356. August 2005.
- MONTAG, J.; SCHREIBER, L.; SCHÖNHERR, J. An in vitro study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 474 – 481, 2006.
- MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; ALSOHIM, A. S.; ABDALLAH, R. R. Botryticidal activity of nanosized silver-chitosan composite and its application for the control of gray mold in strawberry. **Journal of Food Science**, vol. 78, n.10, 2013.
- NASSAR, A. M .K. Effectiveness of silver nano-particles of extracts of *Urtica urens* (*Urticaceae*) against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Asian Journal of Nematology**, v. 5, p. 14-19, 2016.
- NAVROTSKY, A. Nanomaterials in the environment, agriculture, and technology (NEAT). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 321–323, 2000.
- NNI. NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. Environmental, health, and safety research needs for engineered nanoscale materials. **Office of science and technology policy**, Washington, D. C., p. 1 – 80, September 20, 2006. Disponível em: <https://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/nni_ehs_research_needs.pdf>. Acesso em: 06 de outubro de 2020.
- ORDAX, M. et al. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 3482-3488, 2006.
- PARK, H. J. et al. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. **The Plant Pathology Journal**. v. 23, ed. 3, p. 295 – 302, 2006.
- PEREIRA, A. B. **Fontes de cobre no controle da ferrugem do cafeeiro**. 2018. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2018.
- PÉREZ, C. D. P. et al. Impact of nitrogen and potassium on coffee rust. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 219–229, 2019.
- POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: MACHADO, A. K. F. M. et al. (Org.). **Avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**. 1ed. Suprema Gráfica e Editora: p. 259 -282. São Carlos, 2012.
- POZZA, E.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALZA, D. P. (Eds).

Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, p. 69 – 106, 2010.

PULIT, J. et al. Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 795-798, 2013.

RAYNER, R. W. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). **Annals of Applied Biology**, v. 49, p. 497–505, 1961.

RANJAN, S. et al. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. **Journal of Nanoparticle Research**, v.16, p. 24-64, 2014.

RICO, C. M. et al. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 3485–3498, 2011.

RUPARELIA, J. P. et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 4, n. 3, p. 707-716, 2008.

SANTE (2018). Final Renewal report for the active substances Copper compounds. SANTE/10506/2018 Rev. 5. 27 November 2018. European Commission. Health and Consumers Directorate-General, 2018.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SONDI, I.; SONDI, B. S. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**. Elsevier: v. 275, edição 1, p. 177 – 182, July 2004.

STRAYER-SCHERER, A. et al. Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. **Phytopathology**, v. 108, p. 196–205, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. Ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 918p, 2013.

TALAMINI, V. Progresso da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro (*coffea arabica*) com diferentes épocas de início e parcelamentos da fertirrigação. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 27, n.1, p.141-149, 2003.

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

TOMAZELA, A. L. et al. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, n.2, p.192-201, 2006.

US EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Nanotechnology White Paper, p. 1 – 133. **Science Policy Council**. Washington, DC, february, 2007. Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=60000EHU.txt>>. Acesso em: 12 de agosto de 2020.

- US RESEARCH NANOMATERIALS, INC. Nanopowders. Houston, TX 77084, USA. Disponível em: <<https://www.us-nano.com/nanopowders>>. Acesso em: 12 de agosto de 2020.
- VELMURUGAN, N. et al. Synthesis and characterization of potential fungicidal silver nano-sized particles and chitosan membrane containing silver particles. **Iran Polymer Journal**, v.18, p. 383–392, 2009.
- WIGHTWICK, A. M. et al. Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. **J. Agric. Food Chem.** 56:2457–2464, 2008.
- YIRGA, M. Potential Effects, Biology and Management Options of Coffee Leaf Rust (*Hemileia Vastatrix*): A Review. **International Journal of Forestry and Horticulture**, v. 6, p. 19 – 31, 2020.
- YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145 – 156, 2005.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 41(1), p. 1–8, 2016.
- ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.
- ZORRAQUÍN-PEÑA, I. et al. Silver nanoparticles against foodborne bacteria. Effects at intestinal level and health limitations. **Microorganisms**. Ed. 1, v. 8, p. 1-25, 2020.

Tabela A – Experimento I: Análise de variância para o percentual de germinação de esporos de *H. vastatrix*.

FV	GL	SQ	QM	F	Pr(>F)
Dose	4	43290,825	10822,7062 5	3127,0108	0***
Nano	1	1140,05	1140,05	329,3953	0***
Dose*Nano	4	630,575	157,64375	45,5481	0***
Adicional vs Fatorial	1	2046,550	2046,55	591,3109	0***
Resíduo	33	266,500	3,46104		
Total	43	47374.500			
CV(%)			9,66		

Tabela B – Experimento II: Análise de variância para o peso de parte aérea seca (PPAS).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	118,0099427	--	--	--
Doses NPCu	4	6,6775	1,669377	0,578662	3,06
Adicional vs Doses NPCu	1	111,3324352	111,3324	38,59155	4,54*
Bloco	3	13,67991146	4,55997	1,580639	3,29
Resíduo	15	43,2734	2,884891		
Total	23	174,963224			
CV(%)			12,14		

Tabela C – Experimento II: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso da severidade de ferrugem (AACPS).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	4496,751003	--	--	--
Doses NPCu	4	2887,5512	721,8878	234,1459	3,06*
Adicional vs Doses NPCu	1	1609,199809	1609,2	521,9476	4,54*
Bloco	3	6,465858281	2,155286	0,699072	3,29
Resíduo	15	46,2460	3,083068		
Total	23	4549,462881			
CV(%)			8,8		

Tabela D – Experimento II: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso de incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
----	----	----	----	-------	-----------

Tratamentos	5	5938923,543	--	--	--
Doses NPCu	4	21460,4885	5365,122	1,25574	3,06
Adicional vs Doses NPCu	1	5917463,055	5917463	1385,018	4,54*
Bloco	3	35398,88718	11799,63	2,761775	3,29
Resíduo	15	64087,1995	4272,48		
Total	23	6038409,63			
CV(%)		5,98			

Tabela E – Experimento III: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPS).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	12208,2834	--	--	--
Doses NPAg	4	7822,1888	1955,547	529,1192	3,06*
Adicional vs Doses NPAg	1	4386,094641	4386,095	1186,761	4,54*
Bloco	3	34,27468398	11,42489	3,091273	3,29
Resíduo	15	55,4378	3,695854		
Total	23	12297,99589			
CV(%)		5,54			

Tabela F – Experimento III: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	11242957,77	--	--	--
Doses NPAg	4	571565,1252	142891,3	19,04852	3,06*
Adicional vs Doses NPAg	1	10671392,65	10671393	1422,58	4,54*
Bloco	3	25879,09696	8626,366	1,149962	3,29
Resíduo	15	112521,5355	7501,436		
Total	23	11381358,4			
CV(%)		4,81			

Tabela G – Experimento III: Análise de variância para o peso de parte aérea seca (PPAS).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	18,03866771	--	--	--

Doses NPAg	4	12,2329	3,058217	1,040025	3,06
Adicional vs Doses NPAg	1	5,805800208	5,8058	1,974412	4,54
Bloco	3	20,09731146	6,699104	2,278203	3,29
Resíduo	15	44,1078	2,940521		
Total	23	82,24379896			
CV(%)		9,74			

Tabela H – Experimento IV: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPS).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	13231,27456	--	--	--
Fontes de cobre	4	11004,8439	2751,211	7342,942	3,06*
Adicional vs Fontes de cobre	1	2226,430645	2226,431	5942,311	4,54*
Bloco	3	2,377885286	0,792628	2,115514	3,29
Resíduo	15	5,6201	0,374674		
Total	23	13239,27256			
CV(%)		5,92			

Tabela I – Experimento IV: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	14372909,28	--	--	--
Fontes de cobre	4	3048415,6879	762103,9	555,4101	3,06*
Adicional vs Fontes de cobre	1	11324493,6	11324494	8253,125	4,54*
Bloco	3	10248,21121	3416,07	2,489582	3,29
Resíduo	15	20582,1930	1372,146		
Total	23	14403739,69			
CV(%)		2,13			

Tabela J – Experimento IV: Análise de variância para o peso de parte aérea seca (PPAS).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	5	22,92904068	--	--	--
Fontes de cobre	4	8,2859	2,071465	1,302711	3,06
Adicional vs Fontes de cobre	1	14,64318001	14,64318	9,208858	4,54*
Bloco	3	9,102675529	3,034225	1,908175	3,29
Resíduo	15	23,8518	1,590119		
Total	23	55,88350181			
CV(%)		12,14			

Tabela K – Experimento V: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso do enfolhamento de plantas de caféiro (AACPE).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	6	1086830	181138	1,9326	2,66

Bloco	3	718996	239665	2,5570	3,16
Resíduo	18	1687098	93728		
Total	27	3492924,0			
CV(%)		2,17			

Tabela L – Experimento V: Análise de variância para a área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab (5%)
Tratamentos	6	24674142	4112357	3,1000	2,66*
Bloco	3	4682641	1560880	1,1766	3,16
Resíduo	18	23878018	1326557		
Total	27	3492924,0			
CV(%)		32,8			

Tabela M – Experimento II: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para a área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	133204,44	22200,74	--	--
Tratamentos	4	867391,1	216847,8	4,613348	6,39 ^{ns}
Experimentos	1	13724,71	13724,71	0,291988	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	188017,72	47004,43	0,938419	2,73 ^{ns}
Resíduo	24	1202134,66	50088,94		
TOTAL	39	2404472,63			

Tabela N – Experimento II: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPS).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	19,977	3,3295	-	-
Tratamentos	4	25351,166	6337,792	1120,196456	6,39*
Experimentos	1	1,6402	1,6402	0,28990323	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	22,631	5,65775	1,436053091	2,73
Resíduo	24	94,555	3,939792		
TOTAL	39	25489,9692			

Tabela O – Experimento II: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para o peso de parte aérea seca (PPAS).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	66,4305	-	-	-
Tratamentos	4	13,355	3,33875	1,103974	6,39 ^{ns}
Experimentos	1	3,9627	3,9627	1,310287	7,71 ^{ns}

Trat. x Exp.	4	12,0972	3,0243	0,261477	2,73
Resíduo	24	277,5888	11,5662		
Total	39				

Tabela P – Experimento III: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPS).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	83,4639	13,91065	-	-
Tratamentos	4	15612,47	3903,118	372,2032	6,39*
Experimentos	1	3,0158	3,0158	0,287588	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	41,9461	10,48653	1,701826	2,73
Resíduo	24	147,8862	6,161925		
Total	39	15888,78			

Tabela Q – Experimento III: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para a área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	182635177	30439196	-	-
Tratamentos	4	85858564	21464641	2,778847	6,39 ^{ns}
Experimentos	1	6544987	6544987	0,847325	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	30897186	7724297	0,493294	2,73
Resíduo	24	375806491	15658604		
Total	39	681742405			

Tabela R – Experimento III: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para o peso de parte aérea seca (PPAS).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	70,5073	11,75122	-	-
Tratamentos	4	24,4657	6,116425	1,358526	6,39 ^{ns}
Experimentos	1	0,2372	0,2372	0,052685	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	18,009	4,50225	0,835935	2,73
Resíduo	24	129,2613	5,385888		
Total	39	242,4805			

Tabela S – Experimento IV: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para a área abaixo da curva de progresso da severidade da ferrugem (AACPS).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	6,518	-	-	-
Tratamentos	4	22006,04	5501,51	7148,3	6,39*
Experimentos	1	0,009	0,009	0,011694	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	3,0785	0,769625	0,868325	2,73
Resíduo	24	21,272	0,886333		

Total	39	22036,919
-------	----	-----------

Tabela T – Experimento IV: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para a área abaixo da curva de progresso da incidência da ferrugem (AACPI).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	29.337	4889,461	-	-
Tratamentos	4	6096819,97	1524205	3250,162	6,39*
Experimentos	1	1827,904	1827,904	3,897759	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	1875,851	468,9628	0,117441	2,73
Resíduo	24	95835,858	3993,161		
Total	39	6225696,35			

Tabela U – Experimento IV: Análise conjunta de dois experimentos repetidos no tempo para o peso de parte aérea seca (PPAS).

FV	GL	SQ	QM	F (calc)	F (tab; 5%)
Blocos/Experimentos	6	29,166	4,861	-	-
Tratamentos	4	16,5717	4,142925	0,585734	6,39 ^{ns}
Experimentos	1	0,8607	0,8607	0,121687	7,71 ^{ns}
Trat. x Exp.	4	28,2922	7,07305	2,103621	2,73
Resíduo	24	80,6957	3,362321		
Total	39	155,5863			