



RAFAEL JÚNIOR VIEIRA

**NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE NO
CONTROLE DA
MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

**LAVRAS-MG
2021**

RAFAEL JÚNIOR VIEIRA

**NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE NO CONTROLE DA
MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

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

Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador(a)

Dr. Edson Ampélio Pozza
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2021**

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

Vieira, Rafael Júnior.

Nanopartícula de óxido de cobre no controle da mancha aureolada do cafeeiro / Rafael Júnior Vieira. - 2021.

55 p. : il.

Orientador(a): Ricardo Magela de Souza.

Coorientador(a): Edson Ampélio Pozza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Coffea arabica. 2. controle químico. 3. Pseudomonas syringae pv garcae. I. Souza, Ricardo Magela de. II. Pozza, Edson Ampélio. III. Título.

RAFAEL JÚNIOR VIEIRA

**NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE NO CONTROLE DA
MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 06 de outubro de 2021.

Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA
Nilvanira Donizete Tebaldi	UFU

Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador(a)

Dr. Edson Ampélio Pozza
Co-orientador

LAVRAS -MG

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sua presença em minha carreira e estudos, em meio a dificuldade, medo e incertezas de um final de mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de cursar o mestrado. Como foi gratificante para mim ter acesso a grandes nomes da Fitopatologia, o aprendizado em estudar as patologias, os mecanismos e as interações entre plantas e patógenos. Para mim, foi uma pós-graduação louvável.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de recursos financeiros para execução dos projetos de pesquisa.

Em um dos momentos mais desafiadores do século, que o mundo tem passado, a pandemia veio mostrar que as preocupações de nossa vida corrida e inconsequente, não são mais importantes que a saúde e o contato humano. Os dias estão sendo de solidão, silêncio e pesquisa, porém sempre existem aquelas pessoas especiais que insistem em permanecer presentes. Meus agradecimentos.

Aos meus familiares, pessoas preciosas que confiaram em minha trajetória. Que não mediam esforços para me tranquilizar quando a quarentena me isolava do aconchego de casa.

Ao Professor Ricardo Magela de Souza que me orientou em todo meu mestrado, com muita compreensão e carinho.

Ao Professor Edson Ampélio Pozza por toda paciência e compromisso no desenvolvimento da dissertação. Estendendo o agradecimento a todos do Laboratório de Epidemiologia de Plantas.

Ao Professor Mario Lúcio por toda contribuição e parceria neste trabalho.

À Ana Maria, Sarah e ao Tarcísio, colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Que me auxiliaram nas atividades. Em especial à Técnica Ana Maria, que em vários momentos foi minha única companhia, durante a implantação e análises experimentais.

Aos meus amigos da república, que em meio as ligações que noticiavam as confirmações do vírus em nossos entes queridos, nosso companheirismo era o esteio para não desistirmos.

Ao Vinícius Samuel e família, que acompanham minhas conquistas com carinho e satisfação.

A todos minha gratidão

RESUMO

A Mancha Aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* - Psg) é a principal bacteriose que afeta o cafeeiro. Em condições favoráveis, clima ameno e lavouras expostas a ventos e umidade, a doença ocasiona prejuízos em viveiros e plantas adultas. Em áreas que contêm o patógeno, os métodos de controle recomendados se limitam ao uso de preventivos (cúpricos) e curativos (antibióticos), porém a utilização sucessiva desses produtos pode acarretar contaminação ao meio ambiente a longo prazo e também levar à seleção de isolados de Psg resistentes. Desta forma, pesquisas estão sendo realizadas afim de encontrar formulações mais eficientes quanto a atividade antimicrobiana, como as nanopartícula de cobre. Assim, objetivou-se com este trabalho testar a eficiência da nanopartícula de óxido de cobre (CuO NP) no controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro em comparação aos produtos convencionais. Foram realizados dois experimentos: no primeiro foi avaliado o efeito antibacteriano *in vitro* de diferentes concentrações de NP CuO (0, 25, 50, 100, 200, 400 mg.L⁻¹) a isolados de Psg resistentes e sensíveis ao CuSO₄. No segundo experimento, os isolados UFLA 52 e UFLA 103, respectivamente sensível e resistente a nanopartícula de cobre *in vitro*, foram inoculados em mudas de cafeeiro previamente tratadas com a dose mais eficaz obtida no ensaio *in vitro* e com três produtos comerciais (Casumin[®], Big Red[®] e Supera[®]). Exposições a partir das concentrações de 25 mg.L⁻¹ apresentaram efeito inibitório no crescimento dos isolados, sendo a dose próxima de 200 mg.L⁻¹ a mais eficiente, com redução de 38.04% e 4.73% para o UFLA 52 e UFLA 103 respectivamente. O efeito da NP CuO na eficiência de redução da severidade da doença foi de 27.82%, para as mudas inoculadas com o isolado sensível, e 24.21% para as mudas inoculadas com o isolado resistente NP CuO, portanto semelhante estatisticamente aos produtos comerciais. Esses resultados sugerem a necessidade de aprofundamento nos estudos de diferentes nanopartículas, bem como nas avaliações biológicas para viabilizar a utilização destas como formulações antibacterianas para proteção do cafeeiro contra a Mancha Aureolada.

Palavras-chave: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, controle químico, *Coffea arabica*

ABSTRACT

Bacterial Blight Spot (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae* - Psg) is the main bacteriosis that affects coffee crops. Under favorable conditions, mild climate and crops exposed to wind and humidity, the disease causes damage to nurseries and adult plants. In areas with the presence this pathogen, the recommended control methods are the use of preventatives (copper based products) and curatives (antibiotics), but the successive use of these products can lead to long-term environmental contamination and also lead to the selection isolates resistant Psgs. Thus, research is being carried out in order to find more efficient formulations in terms of antimicrobial activity, such as copper nanoparticles. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficiency of the copper oxide nanoparticle (CuO NP) in the control of Coffee Bacterial Blight Spot compared to conventional products. Two experiments were carried out: in the first one, the in vitro antibacterial effect of different concentrations of NP CuO (0, 25, 50, 100, 200, 400 mg.L⁻¹) was evaluated against Psg isolates resistant and sensitive to CuSO₄. In the second experiment, the isolates UFLA 52 and UFLA 103, respectively sensitive and resistant to copper nanoparticle in vitro, were inoculated in coffee seedlings previously treated with the most effective dose obtained in the in vitro test with three commercial products (Casumin®, Big Red® and Supera®). Exposures from concentrations of 25 mg.L⁻¹ showed an inhibitory effect on the growth of the isolates, with a dose close to 200 mg.L⁻¹ being the most efficient, with a reduction of 38.04% and 4.73% for UFLA 52 and UFLA 103 respectively. The effect of NP CuO on the efficiency of disease severity reduction was 27.82% for seedlings inoculated with the sensitive isolate, and 24.21% for seedlings inoculated with the resistant isolate NP CuO, therefore statistically similar to commercial products. These results suggest the need for further studies of different nanoparticles, as well as biological evaluations to enable their use as antibacterial formulations to protect the coffee crop against Bacterial Blight Spot.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, chemical control, *Coffea arabica*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	IMPORTÂNCIA DO CAFÉ NO BRASIL	12
2.2	MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO	12
2.3	O COBRE	16
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	24
4.1	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE.....	24
4.2	SENSIBILIDADE DOS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>GARCAE</i> <i>IN VITRO</i> ÀS DOSES DE NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE.....	25
4.3	APLICAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE COBRE EM MUDAS DE CAFÉ INOCULADAS COM ISOLADOS RESISTENTE E SENSÍVEL DE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>GARCAE</i>	26
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES ISOLADOS DE PSG <i>IN VITRO</i> A NP CuO.....	30
5.2	NANOPARTÍCULAS DE CuO NO CONTROLE DA MANCHA AUREOLADA DO CAFEIEIRO.....	36
6	CONCLUSÃO.....	44
7	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. Em 2021 é esperada uma produção por volta de 46,7 milhões de sacas de café colhidos e Minas Gerais é o principal estado produtor, e compreendendo 52,27 % de toda a área produtora do país (CONAB, 2021). De janeiro a agosto de 2021, foram destinados à exportação 26,3 milhões de sacas/60kg (CECAFÉ, 2021). Entretanto, há vários fatores, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais, pragas e doenças que podem afetar a produtividade da cultura, causando perdas significativas.

A Mancha Aureolada do Cafeeiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL, TEIXEIRA E PINHEIRO, 1956) Young, Dye & Wilkie 1978 (Psg), tem se destacado na cafeicultura brasileira, nos últimos anos, como uma das principais doenças dessa cultura. Ela foi constatada pela primeira vez em 1955, na região de Garça, no Estado de São Paulo (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956). Inicialmente a doença era mais comum nas regiões cafeeiras mais frias, como os Estados do Paraná e São Paulo, porém, tem sido relatada nas zonas cafeeiras do Cerrado Mineiro (Triângulo e Alto Paranaíba), Sul de Minas e áreas de Matas de elevadas altitudes (ZOCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

Recentemente, sérios prejuízos foram também observados em viveiros e lavouras novas com até 4 anos (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Em viveiro comercial de mudas em Nepomuceno MG, Belan et al. (2015) ao caracterizar a distribuição espacial da Mancha Aureolada do Cafeeiro, verificou a incidência da doença em 56 % das mudas com 61 dias após a primeira avaliação. Oliveira (2017) ao avaliar a incidência da doença em lavouras de café, observou o pico de 70 a 80 % de plantas doentes, em temperaturas em torno de 20°C e precipitação acima de 125 mm por mês.

Os sintomas da doença são observados nas folhas, flores, frutos novos e ramos do cafeeiro. Manchas de coloração pardo-escuro, formato irregular, envolvidas por halo amarelo são observadas nas folhas mais velhas. Nas folhas novas, as lesões apresentam formato circular e são circundadas por um halo amarelo, que pode não ser notado, mas ao se observarem as folhas sintomáticas contra a luz é possível verificar uma transparência nessa região (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Em decorrência desses sintomas ocorre a queda das folhas e diminuição da produção de fotoassimilados na planta, além da queda de flores, frutos chumbinhos e conseqüentemente diminuição da produtividade. Em viveiros ocorre desfolha, morte de ponteiros, podendo levar até a morte de mudas (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014).

A disseminação de *Psg* ocorre facilmente por meio de mudas infectadas, água de irrigação, rajadas de ventos, equipamentos de podas e trânsito de máquinas em áreas de cultivo (BELASQUE; BEDENDO, 2018). Com base nessas informações, medidas de manejo vêm sendo empregadas para tentar prevenir a disseminação e o estabelecimento do patógeno nos campos de produção. O uso de cultivares resistentes é a melhor opção de controle da Mancha Aureolada, entretanto a doença ocorre com destaque para cultivares do grupo ‘Mundo Novo’, as mais suscetíveis (CARDOSO; SERA, 1983). Entre as medidas de controle está o plantio de mudas saudáveis e a aplicação de bacteriostáticos e bactericidas, que porém têm sido pouco eficientes (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014).

As moléculas cúpricas vêm sendo utilizadas no controle preventivo dessa doença, devido a formação de uma película protetora de cobre na folha, dificultando a penetração do patógeno (ORDAX et al., 2006). Para o controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro as doses recomendadas dos produtos à base de cobre variam de 2250 a 4500 mg.kg⁻¹ (AGROFIT, 2021). Os cobres fixos mais comumente utilizados, como hidróxido de cobre, óxido cuproso e oxicloreto de cobre, possuem baixa solubilidade e são facilmente lixiviados, podendo contaminar os solos e lençóis freáticos. A Dinamarca e Holanda são exemplos de países da União Europeia que estão restringindo a utilização de cobre, devido às contaminações nos campos de produção (LAMICHHANE et al., 2018). Consequentemente, o interesse em usar nanotecnologia, para reduzir a dose aplicada e resolver essas ineficiências tem aumentado (MA et al., 2019).

As nanopartículas inorgânicas apresentam alta relação superfície-volume, o que facilita as reações e liberação do Cu²⁺ em concentração bem inferior aos defensivos comuns sem comprometer sua eficácia, podendo evitar efeitos negativos de lixiviação, contaminação de solos e lençóis freáticos e excesso de gastos financeiros. Sua estrutura favorece maior ação antimicrobiana, o que potencializa as multifuncionalidades existentes no nanometal de forma mais precisa para controle de bactérias e fungos fitopatogênicos.

Especificamente as nanopartículas de cobre tem sido um tópico de pesquisa recente, principalmente devido às diversas atuações na planta, como micronutriente para nutrição e componente das vias de defesa, e como agente antimicrobiano (MA et al., 2019). Diversos trabalhos constataram a eficiência das nanopartículas no controle de bactérias fitopatogênicas, como *Xanthomonas campestris* (GHORBANI; MORADIAN; BIPARVA, 2018), *X. oryzae* pv. *oryzae* (MAJUMDAR et al., 2019), *X. perforans* (STRAYER, 2018), *P. syringae* (BANIK; LUQUE, 2017), *P. syringae* pv. *tomato*. (LI; YANG; CUI, 2017) e *Erwinia amylovora* (GKANATSIU et al., 2019).

Diante disso, neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito antibacteriano *in vitro* de diferentes doses da nanopartícula de óxido de cobre (NP CuO) à estirpes de *P. syringae* pv. *garcae*, com diferentes níveis de sensibilidade ao cobre, e avaliar a eficácia de NP CuO e de produtos comerciais no controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do café no Brasil

Coffea arabica L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner são as espécies mais utilizadas para o consumo, ambas são pertencentes à família *Rubiaceae*. O café é originário da Etiópia na região de Kafka, no centro da África e está entre as culturas de maior importância econômica em todo mundo, sendo amplamente cultivado em países tropicais (ALVES, 2011). A produtividade média de café arábica esperada para o ano de 2021 é de 22,7 sacas/ha e a produção de 31.354,9 milhões de sacas beneficiadas, safra essa inferior à passada em razão da sua bialidade positiva de 2020 (CONAB, 2021).

Os parques cafeeiros de arábica são formados por aproximadamente 6 milhões de plantas, sendo 70% presentes apenas no Estado de Minas Gerais, consagrado como o maior centro cafeeiro do País. A cultura enfrenta obstáculos em relação à enfatizada competitividade do café por ser o Brasil o maior produtor e exportador mundial (OLIVEIRA; MEDINA; FIGUEIREDO, 2019). A espécie *C. arabica* possui 135 cultivares registradas, sendo, portanto, a mais cultivada e consumida no país (MAPA, 2021). De acordo com Bliska et al. (2018) as cultivares Catuaí, Mundo Novo e Acaí são as mais presentes nos parques cafeeiros e suscetíveis às principais doenças da cultura, incluindo a Mancha Aureolada do Cafeeiro.

2.2 Mancha Aureolada do Cafeeiro

A Mancha Aureolada do Cafeeiro foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1955 na cidade de Garça, Estado de São Paulo. Posteriormente, provavelmente em decorrência do livre comércio de mudas e expansão das áreas de produção, logo a doença foi também relatada em outros estados, como Paraná (MOHAN, 1976), Minas Gerais, nas regiões do Triângulo, Alto Paranaíba e Sul (ZOCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011), Espírito Santo, em viveiros sombreados de café conilon (VENTURA et al., 2007) e em Rondônia, em áreas de cafeeiro no município de São Miguel do Guaropé (VIEIRA et al., 2015). A doença também foi detectada em outros países tropicais, como Uganda (CHEN, 2002), Etiópia e Quênia (RAMOS; SHAVDIA, 1976; KOROBKO; WONDIMAGEGNE, 2018), e na China (XUEHUI et al., 2013).

Os sintomas da doença ocorrem em viveiro de mudas e em lavouras no campo. Em mudas de cafeeiro, os sintomas iniciais nas folhas são pequenas lesões necróticas, irregulares, anasarcadas, de coloração marrom escuro, que aumentam em tamanho, sendo posteriormente circundadas por halos amarelados. A seguir, a bactéria se dissemina pela própria planta e para mudas adjacentes, podendo colonizar também tecidos do caule e do ápice, causando necrose

das folhas novas e do ponteiro, superbrotamento e até a morte das mudas (RODRIGUES et al., 2013).

Em condições de campo os sintomas característicos são lesões foliares necróticas irregulares, inicialmente anasarcadas, de coloração marrom escuro, circundadas por halo amarelado, que podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas. A doença também ocorre em rosetas, frutos (frutos novos são mais suscetíveis) e ramos do cafeeiro, causando queda prematura de folhas e seca das hastes e dos ramos. Na tentativa de se recuperar, as plantas emitem novos ramos, originando sintomas de superbrotamento mudas (RODRIGUES et al., 2013).

Os sintomas da Mancha Aureolada podem ser semelhantes à *Cercospora-Negra* (*Cercospora coffeicola*) e Mancha de Phoma (*Phoma tarda*) e também podem ser parecidos com injúrias causadas por fatores climáticos e distúrbios nutricionais (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

2.2.1 Etiologia

O agente etiológico da Mancha Aureolada do Cafeeiro é *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (AMARAL, TEIXEIRA E PINHEIRO, 1956) Young, Dye & Wilkie 1978 (Psg). A bactéria pertencente ao filo *Proteobacteria*, classe *Gamma Proteobacteria*, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, é Gram negativa, tem formato de bastonetes levemente curvos de 0,5-1,0 x 1,5 – 5,0 µm, com flagelos polares (RODRIGUES et al., 2013). Em meio de cultura King B produz pequena quantidade de pigmentação fluorescente (RAIMUNDI et al., 2021). A produção de melanina pode ser observada quando o patógeno é isolado em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) e NA (Nutriente Agar). Barta e Wills (2005) encontraram resultado positivo para utilização como fonte de carbono de D-sorbitol e negativo para D (-) tartaro, lactato e trigonelina.

De acordo com Lelliott, Billing e Hayward (1966) a bactéria enquadra-se no grupo I das bactérias fluorescentes. Nos testes LOPAT (Levana, Oxidase, Podridão em batata, Arginina e Hipersensibilidade em fumo) é positiva para levana e induz hipersensibilidade em fumo, negativa para oxidase, podridão em discos de batata, arginina di-hidrolase, hidrolisa gelatina (RAIMUNDI et al., 2021) e não acumula Poli- β- hidroxibutirato.

2.2.2 Epidemiologia

Para ocorrer a infecção da Psg, segundo Freitas (2017) são necessárias condições climáticas favoráveis, como temperaturas diurnas de aproximadamente 28 °C, que favorecem a sua multiplicação, e para as condições de pré e pós penetração as temperaturas ideais são

aquelas em torno de 19.2 °C. A presença de chuvas contínuas contribui para a formação de um filme de água que beneficia a sobrevivência e colonização na superfície da folha (ROMEIRO, 2001a).

A disseminação em viveiros, sob condições de adensamento e excesso de umidade, ocorre pelo contato direto entre as mudas, ação de chuvas, ventos ou por sementes. Belan et al. (2016) encontraram inóculo viável em sementes provenientes de plantas infectadas com *Psg*. Segundo Zocolli, Takatsu e Uesugi, (2011) a ocorrência da doença em viveiros pode causar perdas de até 70%. Belan et al. (2015) também relataram epidemia da mancha aureolada em viveiro com 56% de incidência em mudas, aos 61 dias após a primeira avaliação. As mudas contaminadas representam o inóculo inicial para a disseminação a longas distâncias, quando transportadas para novas áreas de plantio (CARVALHO; CHALFOUN, 1998). Oliveira (2017) ao avaliar o progresso da mancha aureolada em viveiros, observou o início da epidemia 15 dias após a introdução do inóculo inicial, com duração da epidemia correlacionada ao tempo de molhamento foliar e velocidade do vento.

As fitobactérias, diferentemente dos fungos, não possuem estruturas para romper as barreiras das folhas ao estabelecer o sítio de infecção, portanto, a penetração é passiva (ROMEIRO, 2001a). A penetração passiva acontece por meio de entradas naturais ou ferimentos, que liberam substâncias químicas que possibilitam o movimento flagelar direcionado (quimiotactismo positivo), possibilitando a entrada no cafeeiro (BELASQUE; BEDENDO, 2018).

O café é uma cultura perene que demanda diversos tratamentos culturais quando implantado, tal como diferentes tipos de podas, pulverizações e trânsito de máquinas. Dessa maneira, o manejo proporciona lesões (ferimentos) nas plantas, que servem de entrada para a fitobactéria (BELASQUE; BEDENDO, 2018).

As entradas naturais presentes e numerosas nas folhas representam outro fator importante para a infecção da planta. Os estômatos, hidatódios e nectários, presentes nas folhas e flores, são meios de acesso ao interior da planta. Um gradiente populacional da bactéria é formado às margens das entradas naturais e ferimentos, sem haver nenhuma via preferencial no processo de infecção (SOUZA et al., 2019).

Após a penetração *Psg* se estabelece na parte aérea do cafeeiro, colonizando os espaços intercelulares das folhas, que contém água livre, para se nutrirem das células hospedeiras e se multiplicar (Romeiro, 2001a). A bactéria produz a fitotoxina denominada tabtoxina, que afeta as funções das plantas, atuando como fator de virulência, não sendo essencial para o estabelecimento do fitopatógeno (ROMEIRO, 2001a).

A tabtoxina atua inativando de forma irreversível a enzima glutamina sintetase, que desencadeia o acúmulo de amônia tóxica, o desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição da fotossíntese e fotorrespiração (BALLIO et al., 1991). Outras consequências são a deficiência de glutamina na célula, a qual participa da síntese de proteínas relacionadas à defesa do cafeeiro, e o aparecimento de clorose nas folhas seguidas de lesões necróticas, circundadas por um halo amarelado (BALLIO et al., 1991). A produção dessa fitotoxina está relacionada ao gene *tblA* do cromossomo BR2 que codifica uma proteína de 231 aminoácidos e está relacionada à produção de tabtoxinina-beta-lactona, parte tóxica da tabtoxinina liberada no interior do tecido vegetal. (MANNING; DANSON; CALDERONE, 2018).

2.2.3 Métodos de Controle

Os métodos de controle mais eficientes estão associados às medidas de exclusão, as quais consistem em combater e/ou dificultar a entrada e disseminação do fitopatógeno na lavoura, por meio da utilização de sementes e mudas sadias, escolha de áreas livres da doença, formação de quebra-ventos ao redor da lavoura, pulverização de preventivos (cúpricos) após operações culturais, como podas, e limpeza de maquinários após os tratamentos culturais (BELAN; POZZA; SOUZA, 2014).

Em lavouras em que bactéria já ocorre, deve-se recorrer aos métodos de erradicação. O controle é restrito limitando-se à utilização de antibióticos (curativo) e cúpricos (preventivo), contudo, pouco eficientes dependendo das condições climáticas e severidade da doença. O número de defensivos registrados para o controle de Psg no sistema de agrotóxicos fitossanitários se restringe ao antibiótico Casugamicina e aos cúpricos (preventivo), como oxicloreto de cobre e óxido cuproso (AGROFIT, 2021).

Métodos culturais, como a adubação eficiente e adequada para fornecer à planta os nutrientes necessários, podem aumentar suas defesas aos patógenos e reduzir o número de pulverizações no controle de doenças. Perez et al. (2017) avaliaram o efeito das doses de nitrogênio em solução nutritiva na intensidade da Mancha Aureolada do Cafeeiro e observaram redução da severidade da doença até a dose 13,34 mmol L⁻¹ N.

Em viveiros localizados em altitudes elevadas é necessário a utilização de quebra-ventos, a compra de sementes e mudas sadias certificadas e a pulverização quinzenal de forma preventiva, devido à alta perda de mudas causadas pela doença (ZAMBOLIM, 2015). Outra opção para controle é a utilização de cultivares resistentes ao patógeno. Sementes de cafeeiros resistentes já podem ser comercializadas, tal como a cultivar IPR 102 e IPR 106 (CARDUCCI et al., 2017).

2.3 O cobre

O primeiro relato da utilização do cobre na agricultura, ocorrido no ano de 1885 no controle do míldio da videira, foi mencionado ao cientista Pierre-Marie-Alexis Millardet (1838 - 1902). A mistura de cobre com Cal ficou conhecida como calda bordalesa (LAMICHHANE et al., 2018).

O cobre (Cu) é um micronutriente metálico cuja absorção acontece em forma iônica Cu^{2+} e Cu-quelato, com redistribuição restrita no floema (pouco móvel). No metabolismo da planta atua como ativador enzimático, carreador de elétrons associado à plastocianina nos cloroplastos e processos de oxirredução (FAQUIN, 2005).

Na respiração, o cobre atua na fosforilação oxidativa juntamente com o ferro (Fe^{3+} a Fe^{2+}). De acordo com Faquin (2005) esse metal está associado ao complexo citocromo oxidase da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (respiração). Além disso, o cobre participa como co-fator da enzima antioxidante superóxido dismutase, localizada nos cloroplastos e citosol, que tem ação de decompor algumas espécies reativas de oxigênio decorrentes da explosão oxidativa da planta em resposta a algum estresse abiótico ou biótico (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

O cobre também tem papel importante na lignificação do xilema e parede celular. Este metal ativa enzimas polifenol oxidase e oxidase diamina, que atuam na oxidação de compostos fenólicos precursores da lignina (MARSCHNER, 2012). A lignina é um polímero fenólico unido por subunidades de álcool que fornece à planta resistência mecânica à infecção de patógenos. Estas subunidades são sintetizadas pela fenilalanina e oxidadas no local pelas peroxidase e lactase (TAIZ; ZEIGER, 2009; SAKIYAMA et al., 2015). Utilizando produtos à base de cobre Guimarães et al. (2011) conseguiram incremento significativo na lignificação dos tecidos do cafeeiro em relação à testemunha.

O fornecimento de cobre para suprir as necessidades nutricionais da planta pode ser via solo, na proporção de 8 a 16 mg.L^{-1} Cu de matéria seca (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999), ou aplicação foliar, de 10 a 50 mg.L^{-1} de Cu (MATIELLO, 2005). Contudo, ao ultrapassar esse limite o cobre pode ficar livre no citoplasma e causar desordem no metabolismo celular.

O produtor de café deve ficar atento, pois as pulverizações foliares com fungicidas cúpricos, usadas no manejo das principais doenças fúngicas e bacterianas, fornecem as quantidades nutricionais suficientes (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999). Diferentes dos cúpricos fixos, os fertilizantes foliares a base de cobre apresentam maior toxicidade à planta,

devido a sua capacidade de penetração e conseqüentemente menor cobertura foliar, como nitrato e sulfato de cobre complexado com gluconatos (FREITAS, 2017)

Os fungicidas cúpricos mais utilizados são o oxiclureto, o hidróxido e o sulfato de cobre e o óxido Cuproso (FRAC, 2021). Os cobres fixos são compostos insolúveis ou de baixa solubilidade com maior retenção foliar, que precisam formar uma camada protetora no tecido vegetal, antes do estabelecimento do patógeno (LOPES; JUNIOR; FONSECA 2018).

Uma diversidade de produtos cúpricos, com diferentes formulações, granulometria e dosagens, são comercializados, o que influencia no controle de doenças. De acordo com Paula (2018), a diferença no tamanho da partícula afeta diretamente na distribuição do cobre na área foliar e resulta em diferentes níveis de controle entre eles, com maior eficiência encontrada para óxido cuproso SC com 90% de distribuição, seguido por oxiclureto de cobre PM, hidróxido de cobre SC e óxido cuproso PM, respectivamente.

O cobre é um metal com propriedades antimicrobianas devido a sua habilidade de aceitar ou doar facilmente seus elétrons no processo de oxirredução. Essa propriedade química permite que os íons de cobre alterem as funções normais das enzimas dentro das células dos patógenos e das plantas. De acordo com Graham e Webb, (1991), o cobre está ligado à formação de compostos fenólicos (quinonas e fitoalexinas) na planta, a concentração foliar de Cu^{2+} reduz a atividade de enzimas peroxidases e catalase, provocando aumento da respiração no tecido foliar, acumulando peróxido, substância com propriedades bactericidas.

A ação antimicrobiana dos cúpricos também está relacionada à liberação de cátions Cu^{+2} , que formam complexos com sulfidrilas, hidroxilas e carboxilas de enzimas ou outros compostos dos fungos, responsáveis por atuar em diferentes processos bioquímicos importantes para sua sobrevivência (RODRIGUES, 2006). O acúmulo desse metal inativa grupos sulfidrilicos presentes na catalase, sacarase, arginase beta-glucosidase, asparaginase o que desencadeia a desordem geral do metabolismo rompendo a integridade celular (GARCIA, 1999).

A toxidez por sulfato de cobre também desestabiliza a regulação de cofatores ferro-enxofre que estão envolvidos em vias associadas à biossíntese de cisteína (CHILLAPPAGARI et al., 2010). Promove o estresse oxidativo, que induz a produção de espécies reativas de oxigênio (superóxido e peróxido de hidrogênio), e causa mudanças significativas no metabolismo celular (CHILLAPPAGARI et al., 2010).

A utilização do cobre como barreira tóxica em ramos, folhas e frutos atua no controle de patógenos, com largo espectro de ação contra fungos. Sua ação é erradicante protetora, atuando especificamente sobre a germinação dos esporos e inativando proteínas essenciais-

Grupo SH da metionina (BALARDIN, 2017). Em ensaio *in vitro* oxiclureto de cobre reduziu drasticamente o crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*, sendo que na concentração 1500 mg.L⁻¹ em meio de cultura o crescimento micelial foi totalmente inibido (LOMBARDI, 2002).

Os fungicidas cúpricos são comumente usados no manejo preventivo das principais doenças fúngicas do cafeeiro, como a ferrugem (*Hemileia vastatrix*) (MOURA et al., 2018), a mancha de olho pardo (*C. coffeicola*) (REIS; REZENDE; MARQUES, 2018), a mancha de phoma (*Phoma tarda*) (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010) e a mancha de ascochyta (*Ascochyta coffeae*) (SAKIYAMA et al., 2015).

Moléculas cúpricas são também utilizadas para o controle preventivo de fitobactérias. A liberação de íons de cobre tem atividade bacteriostática, inibindo o crescimento bacteriano enquanto houver a película protetora na folha (ORDAX et al., 2006). Ao atravessar a parede celular das bactérias, por meio das porinas, na presença do peróxido de hidrogênio, o Cu²⁺ sofre reações tipo redox (troca de elétrons), e produz radicais hidroxilas (-OH), que danificam macromoléculas celulares, inclusive causando mutações no DNA e alteração na permeabilidade seletiva da membrana plasmática (LI; YANG; CUI, 2017)

A morte bacteriana não é generalizada, parte da população ainda pode sobreviver na superfície foliar, devido ao efeito bacteriostático. As bactérias possuem mecanismos para sua sobrevivência, como para manter a homeostase de cobre dentro de suas células. Na membrana plasmática de bactérias Gram negativas existem as cuproenzimas, que utilizam o Cu²⁺ como co-fatores para realizar sua ação catalítica, ligando-se ao cobre permanentemente. A localização das cuproenzimas é estratégica afim de prevenir a toxicidade no interior da célula (ANDREI et al., 2020). Outra habilidade das bactérias para recuperar suas funções após a retirada do cobre no meio, é a formação de biofilmes. Os biofilmes são comunidades bacterianas com uma matriz de compostos polímeros extracelulares, que protegem e eliminam metabólitos tóxicos e antibacterianos (BOGINO et al., 2013).

As dosagens bacteriostáticas variam de acordo com a espécie, meio de cultivo e formulação. Honório, Goulart e Baquião (2019) observaram efeito inibitório *in vitro* a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* acima de 150 mg.L⁻¹, em meio Kado e Heskett's (1970), enquanto Zocolli, Takatsu e Uesugi, (2011) observaram a paralisação do crescimento 200 mg.L⁻¹ de Cu⁺² em meio composto por 3 g de caseína hidrolisada, 0,6 g de extrato de levedura, 3 ml de glicerina e 18 g de ágar bacteriológico em 1,5 litro de água destilada. Resultados semelhantes foram encontrados por Banik e Sharma (2011) em meio BDA (agar, batata dextrose) na dose 200 mg.L⁻¹ de oxiclureto de cobre.

Yamada (2014) ao avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Psg* em suspensão aquosa, observou inibição do crescimento em concentrações de $20 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$. De acordo com ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, (2011) a quantidade de Cu^{2+} que deverá ser absorvida na folha do cafeeiro após a aplicação, para ter ação bacteriostática no parênquima foliar, está em concentrações próximas a 200 mg.L^{-1} de matéria seca (MS).

Os produtos comerciais a base de cobre registrados para lavouras de café são o óxido cuproso, o hidróxido de cobre e o oxicloreto de cobre, nas doses que variam de 2250 a 4500 mg.L^{-1} (AGROFIT, 2021). As altas doses recomendadas no campo em relação às utilizadas em laboratório resultam das condições ambientais e da planta, que interferem no contato direto dos íons de cobre com as células bacterianas, necessitando para o efeito bacteriostático de maiores concentrações para compensar essas perdas.

O cobre tem sido utilizado de forma preventiva contra diferentes bacterioses em diversas culturas, como na Mancha Bacteriana do Tomateiro, *Xanthomonas perforans* (ROBERT et al., 2008), no Cancro Cítrico, *X. citri* (BEHLAU et al., 2012), Queima Bacteriana da Pereira, *Erwinia amylovora* (ELKING et al., 2015), Podridão Negra das Crucíferas, *X. campestris* pv. *campestris* (NAGAI et al., 2017), Bacteriose da Nogueira, *X. arboricola* pv. *juglandis* (NINOT et al., 2002), Cancro Bacteriano do Kiwi, *P. syringae* pv. *actinidae* (VANNESTE, 2013) e Tuberculose da Oliveira, *P. savastanoi* (TEVIOTDALE; KRUEGER, 2007). No cafeeiro os defensivos cúpricos atuam no controle preventivo de duas bacterioses: Mancha Aureolada, *P. syringae* pv. *garcae*, e Crestamento Bacteriano, *P. cichorii*.

Não há dúvidas da grande demanda e necessidade em relação ao cobre, porém a sua utilização também causa preocupação quando realizada inapropriadamente, o que pode acarretar no seu acúmulo no solo e na água. De acordo com Lamichhane et al. (2018), a utilização de cobre no campo, principalmente em culturas perenes, tem desencadeado um aumento desse metal pesado na superfície do solo.

Existem solos com acúmulo de cobre em áreas de produção em diferentes países do mundo, como Austrália (MERRINGTON; ROGERS; VAN ZWIETEN, 2002), Tanzânia (SENKONDO; TACK; SEMU, 2014), Portugal e Itália (PESSANHA et al., 2010; PROVENZANO et al., 2010), Estados Unidos (YANG et al., 2009) e Brasil (BRUNETTO et al., 2014). Tais solos apresentaram quantidades de cobre metálico até cinquenta vezes acima do aceitável.

Holanda e Dinamarca são países da União Européia que sancionaram leis proibindo a utilização de cúpricos na agricultura convencional e orgânica, em meio a controvérsias e resistência por parte de produtores. A utilização do cobre na agricultura orgânica já se encontra

em discussão e alguns autores já preveem a sua restrição em mais países de forma definitiva (LAMICHHANE et al., 2018). A União Européia estipulou a lei 473/2002 para a redução gradativa ao ano em áreas de cultivo orgânico, devido à preocupação com a segurança alimentar que impõem níveis máximos de resíduos de Cu de 5 mg.Kg^{-1} de peso dos alimentos (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Encontrar meios de substituir ou reduzir as quantidades de cobre é ainda um grande desafio, já que seu modo de ação tem atividade de amplo espectro, porém há uma demanda da sociedade em reduzir a dependência da agricultura ao cobre, exigência que atua como incentivo necessário para pesquisas voltadas a melhores formas de sua utilização.

2.3.1 Otimização do uso de cobre: nanopartículas

As nanopartículas são materiais com 1 a 100 nanômetros (nm), podendo ser projetadas com diferentes formatos e dimensões específicas como esferas, folhas, hastes e até arranjos mais complexos como nanotubos de carbono. As propriedades das nanopartículas em relação a seus equivalentes com massas maiores têm ação reativa mais potencializada devido ao seu tamanho nano e maior relação superfície volume.

De acordo com Gkanatsiou et al. (2019), em geral a atividade antimicrobiana das nanopartículas é afetada não apenas por sua morfologia e composição (tamanho e forma), mas com a liberação de Cu^{2+} , embora estudos precisam ser realizados para maior elucidação. Borgatta et al. (2018) ao avaliarem a dissolução de dois nanomateriais de diferentes morfologias e composição, observaram diferença na liberação de íons de Cu^+ . As nanofolhas de fosfato de cobre tiveram liberação inicial rápida e contínua em relação as NPs CuO , e a rápida atividade da nanopartícula é uma propriedade que pode influenciar diretamente na eficácia do controle da doença.

Visto como um grande potencial no agronegócio muitos países, como EUA, Japão e União Europeia, tem realizado iniciativas de investimentos em nanotecnologia. Existem aproximadamente mais de 400 empresas no mundo buscando novas formas para sua utilização (GABAL et al., 2018).

Na agricultura têm sido observados resultados do seu emprego no armazenamento pós colheita, manejo de doenças e melhoria da produtividade. Rossi et al. (2019) ao avaliar a resposta fisiológica das mudas de cafeeiro a NP ZnO (10 mg.kg^{-1}) em relação à testemunha, foi observado para raiz e folhas, aumento do peso fresco de 37% e 95% respectivamente. O mesmo autor também obteve com o tratamento com NP ZnO , acréscimo significativo no peso seco da raiz (28%), caule (95%) e folhas (20%). Shah e Belozerova (2009) ao aplicar 130 e 600 mg.L^{-1}

¹ NP CuO no solo, observou acréscimo de 49% e 91% na germinação de sementes de alface, respectivamente.

Na última década houve na Fitopatologia uma pesquisa crescente voltada para a sua aplicação no controle de doenças de planta. As mais encontradas envolvem o uso de óxidos metálicos de ouro, prata e cobre na supressão de patógenos foliares, de caules, frutos e podridões radiculares (BANIK; SHARMA, 2011).

A atividade antibacteriana das nanopartículas de cobre tem sido estudada recentemente. Li, Yang e Cui (2017) observaram a ação das nanopartículas de óxido de cobre sobre *P. syringae* pv. *tomato*, agente da Pinta Bacteriana do Tomateiro. O controle da doença com a nanopartícula foi estatisticamente igual ao comercial Kocide[®] 3000 (hidróxido de cobre) em uma concentração 32 vezes menor.

A atividade antibacteriana de três compostos de cobre de tamanho nano (sílica de cobre, cobre multivalente e quaternário fixo) a isolados de *X. perforans* tolerantes ao cobre em tomateiro, foi eficaz em campo, com a redução de 38% da severidade da doença, nas doses de 100 e 200 mg.L⁻¹. Os resultados foram semelhantes aos produtos Mancozeb[®] e Kocide[®] de cobre metálico de tamanho micron, na dose de 540 mg.L⁻¹ (STRAYER-SCHERER et al., 2018).

A Queima Bacteriana da Romã, ocasionada por *X. axonopodis* pv. *punicae*, é uma das principais doenças da cultura na Índia. Mondal e Mani (2014) ao analisar os efeitos das nanopartículas de cobre, nas doses de 8, 16 e 20 mg.L⁻¹, em folhas de romã inoculadas com spray foliar, verificaram colonização reduzida da bactéria em comparação à testemunha tanto em pré quanto em pós inoculação. A maior supressão da doença, 73%, ocorreu em pré tratamento um dia antes da inoculação. Resultados semelhantes foram encontrados por Mondal, Bhar e Mani (2010) para controle de *X. oryzae* pv. *oryzae* em arroz, com aplicações foliares de 20 mg.L⁻¹ de NP CuO, sete dias antes da inoculação por sprays. Houve redução de 53,85% na severidade da doença em relação à testemunha.

A atividade antibacteriana *in vitro* de nanopartículas de cobre (CuTween20, CuTEG, Cu₂OTWEEN20 e CuOPEG1000) foi comparada ao Kocide[®] 2000 na concentração comercial de 1000 mg.L⁻¹ (GKANATSIU et al., 2019). As bactérias fitopatogênicas foram inibidas pelas nanopartículas de cobre em concentrações de 3 mg.L⁻¹ a 12 mg.L⁻¹ para *E. amylovora*, 75 mg.L⁻¹ para *X. campestris* e 100 mg.L⁻¹ para *P. syringae*, abaixo, portanto, da dose comercial.

Diferentes concentrações de nanopartículas de cobre, 60, 120, 180 e 240 mg.L⁻¹, apresentaram redução *in vitro* de 9, 18, 34 e 97 %, respectivamente, das colônias de *X. campestris* e com efeito bactericida (inexistência de colônia) a partir de 300 e 360 mg.L⁻¹ (GHORBANI; MORADIAN; BIPARVA, 2018).

As nanopartículas de cobre conseguem liberar os íons Cu^{2+} de forma mais precisa, sem necessitar de grandes quantidades para atingir a célula bacteriana. De acordo com Gabal et al. (2018), o modo de ação das nanopartículas de cobre indica a ocorrência de uma interação entre as células bacterianas, através da síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO) em suas membranas, o que ocasiona a degradação de lipídios, proteínas e danos no DNA da fitobactéria.

Alterações na morfologia das células de *P. syringae* pv. *tomato* foram observadas por Li, Yang e Cui (2017) em razão da adesão das cargas opostas entre o cobre (positiva) e parede celular bacteriana (ligeiramente negativa). Desta maneira o nanometal é capaz de formar cavidades na parede celular proporcionando a sua entrada e um ambiente oxidativo dentro das células do patógeno.

Além da indução oxidativa dentro das células do patógeno, pesquisas recentes têm evidenciado as outras multifuncionalidades dos nanocobres, dentre elas, a importância em vias metabólicas de defesa da planta, como agente antimicrobiano. Ma et al. (2019) ao aplicar 500 mg.L^{-1} de nanopartículas de cobre (nanosheets) em tomateiro, verificaram a redução em 31% da incidência da Murcha de Fusarium (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) e um aumento na expressão de genes responsáveis pela defesa da planta, como da polifenol oxidase (PPO) e da proteína de resistência 1A1 (PRP1A1).

Zhao et al. (2017), ao pulverizar plantas de milho com doses de 0, 10 e 100 mg.L^{-1} de nanopartículas Cu(OH)_2 , observaram aumento de forma gradativa de dois aminoácidos aromáticos, tirosina e fenilalanina, precursores dos metabólitos secundários responsáveis por estimular a síntese de compostos importantes para a efetiva defesa das plantas. Os genes responsáveis pela expressão das enzimas antioxidativas, peroxidase (POD1) e glutatona S-transferase (GSTs), promoveram aumento significativo na dose 10 mg.L^{-1} , contudo na dose de 100 mg.L^{-1} a expressão foi reduzida. A enzima POD1 atua na lignificação e defesa contra patógenos (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014) e a enzima GSTs na desintoxicação ocasionada pelas ERO (DIXON et al., 1998).

Em vista do exposto, fica claro o papel do cobre como agente antimicrobiano, pois são mais de treze décadas que a agricultura se beneficia de sua multifuncionalidade em combater patógenos que ameaçam culturas de grande interesse econômico. O cobre ainda hoje é motivo de estudo, devido às técnicas inovadoras que surgem trazendo resultados promissores como as chamadas nanopartículas. Sua forma mais reativa potencializa as diversas funcionalidades nutricionais, antimicrobianas e associadas à resistência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antibacteriano de NP CuO a *P. syringae* pv. *garcae* no controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro.

3.2 Objetivos específicos

i. Avaliar o efeito antibacteriano *in vitro* de diferentes concentrações de NP Cu (0 a 400 mg.L⁻¹) a *P. syringae* pv. *garcae*;

ii. Avaliar a severidade da Mancha Aureolada em mudas de cafeeiro tratadas com NP CuO e cobre convencional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e em câmara de crescimento do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA), Lavras - Minas Gerais.

4.1 Reativação dos isolados bacterianos

Os isolados utilizados foram obtidos da coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. Eles foram selecionados de acordo com os agrupamentos gerados a partir da análise de similaridade baseada em rep-PCR, nível de virulência (RAIMUNDI et al., 2021) e quanto a sensibilidade ao cobre (YAMADA, 2014) (Tabela 1).

Os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* criopreservados em tubos *ependorff* contendo peptona glicerol em ultra freezer a -80°C foram reativados em meio de cultura King B (20g de protease peptona, 15 g de glicerina, 1,5 g de K_2PHO_4 , 1,5 g de MgSO_4 . 18 gr de Agar, 1000 mL de água destilada) (KING; WARD; RANEY, 1954) em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Após a transferência as culturas foram incubadas a 28°C , por 48 horas.

Tabela 1. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, quanto à sensibilidade ao cobre, proveniente de diferentes cultivares de cafeeiro e de diferentes locais de origem.

Isolados	Sensibilidade*	Cultivar	Local
UFLA 52 ²	sensível	Mundo Novo IAC 376-4	Três Pontas, MG
UFLA 77 ³	sensível	Catuai Vermelho IAC-99	Patos de Minas, MG
UFLA 82 ³	resistente	Catuai Vermelho IAC-99	Patos de Minas, MG
UFLA 103 ²	Sensível	Catuai Vermelho IAC-99	Nepomuceno, MG
UFLA 138 ¹	resistente	Mundo Novo IAC 376-4	Patrocínio, MG

Virulência: ¹Menos; ²Moderadamente virulento; ³Mais virulento (RAIMUNDI et al., 2021)

*Sensibilidade *in vitro* a 20 Cu mg.L⁻¹ (YAMADA, 2014).

Fonte: Autor (2021)

4.1 Obtenção das nanopartículas de cobre

Nanopartículas de CuO de 40 nm e pureza de 99%, cor preta, morfologia esférica com densidade de massa de 0.79 g/cm^3 , foram adquiridas, já sonicadas, da empresa americana US Research Nanomaterials Inc. (Houston, TX).

4.2 Sensibilidade dos diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in vitro às doses de nanopartícula de óxido de cobre

A sensibilidade *in vitro* dos diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* às doses de nanopartículas de óxido de cobre foi avaliada por contagem de células viáveis, por análise espectrofotométrica e diluição seriada (ROMEIRO, 2001b) com modificações. Inicialmente os isolados foram recuperados e cultivados em tubos de ensaio contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) em BOD à temperatura de 28 °C, por 48 horas.

4.2.1 Preparo das suspensões estoque de nanopartícula de óxido de cobre

Para o preparo das suspensões estoque primeiramente foram calculadas as quantidades de nanopartículas de óxido de cobre utilizando a fórmula $C_1.V_1 = C_2.V_2$. A partir de uma suspensão estoque de $2.0 \times 10^3 \text{ mg.L}^{-1}$ foram obtidas as concentrações 25, 50, 100, 200, 400 mg.L^{-1} .

4.2.2 Preparo das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina (NaCl 0,85%) estéril, sendo a concentração ajustada para $A_{600} = 0,2$ e a concentração bacteriana 10^8 UFC/ml^{-1} , conforme descrito por Oliveira e Romeiro (1990). Na sequência foram realizadas as diluições decimais seriadas afim de se obter entre 30 e 300 colônias para a contagem em placas (MARIANO, SOUZA, 2016)

4.2.3 Multiplicação de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in vitro sob diferentes doses de nanopartícula de óxido de cobre

Alíquotas de 100 μL das suspensões bacterianas foram transferidas a partir da diluição 10^{-5} para as placas Petri de 90 mm de diâmetro contendo o meio King B (KING; WARD; RANEY, 1954) com as diferentes doses de nanopartículas de óxido de cobre (NP CuO, 40 nm). Com uma alça de Drigalsky foi realizado o espalhamento imediato das alíquotas e, em seguida, as placas foram identificadas e armazenadas em BOD à temperatura de 28 °C. Após 48 horas foram realizadas as contagens do número de colônias. Para cada isolado foram realizadas 4 repetições (placas) por concentração (tratamento), totalizando 24 placas por isolado.

4.2.4 Delineamento experimental e avaliação do experimento in vitro

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma parcela experimental. A análise de

variância foi em esquema fatorial 5 x 6, sendo cinco isolados (UFLA 52, UFLA 77, UFLA 82, UFLA 103 e UFLA 138), seis doses de NP CuO (0, 25, 50, 100, 200, 400 mg.L⁻¹). A contagem do número de colônias foi realizada levando-se em consideração as individualizadas, sem coalescências e, ou, superposições. Um contador eletrônico foi utilizado para facilitar a contagem. Para confirmar os resultados foi realizada a repetição do experimento.

4.3 Aplicação da nanopartícula de cobre em mudas de café inoculadas com isolados resistente e sensível de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento sob temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa $70 \pm 5\%$, condições com maior crescimento populacional Psg (FREITAS, 2017). Mudas de café da cultivar Catuaí Vermelho IAC-99, suscetível a Psg, foram adquiridas de viveiro registrado com certificação sanitária. De acordo com os resultados dos experimentos *in vitro*, foi utilizada a dose da nanopartícula de CuO a 200 mg.L⁻¹, em comparação aos cúpricos e antibióticos recomendados para o controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro, bem como foram selecionados dois isolados, um resistente (UFLA 103) e outro sensível (UFLA 52) ao cobre convencional.

Para confirmar a patogenicidade, os isolados bacterianos foram inicialmente inoculados em mudas e reisolados a partir das folhas sintomáticas, observando-se o crescimento de colônias semelhantes àquelas inicialmente inoculadas. Em seguida, os isolados foram cultivados em meio 523 (KADO & HESKET, 1970) a 28°C , fotoperíodo de 12 horas, por 48 horas e, posteriormente, preparadas as suspensões bacterianas em solução salina (NaCl a 0.85%) esterilizada e ajustada a concentração em espectrofotômetro para $A_{600} - 0.2$ para 10^8 UFC/ml⁻¹ (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990).

A análise de variância foi em esquema fatorial 5 x 2 e o delineamento experimental em blocos casualizados, com 10 tratamentos, cinco repetições com quatro mudas por parcela. Os tratamentos avaliados foram: (1) NP CuO e isolado Psg - UFLA 103, (2) NP CuO e isolado Psg - UFLA 52, (3) Hidróxido de cobre e isolado Psg - UFLA 103, (4) Hidróxido de cobre e isolado Psg - UFLA 52, (5) antibiótico Casugamicina e isolado Psg - UFLA 103, (6) antibiótico Casugamicina e isolado Psg - UFLA 52, (7) Óxido Cuproso e isolado Psg - UFLA 103, (8) Óxido Cuproso e isolado Psg - UFLA 52, (9) Água como testemunha e isolado Psg - UFLA 103 e (10) Água como testemunha e isolado Psg - UFLA 52. (Tabela 2).

Plantas com cinco pares de folhas verdadeiras foram pulverizadas com os produtos químicos, em ambos os lados, até ao ponto de escorrimento. Após sete dias foi realizado a inoculação das bactérias, para melhor ação dos tratamentos nas mudas, (MARCOLINO, 2019).

Tabela 2. Nanopartícula de CuO e produtos químicos recomendados no controle da mancha aureolada do cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* utilizados para os experimentos *in vivo*.

Produto/ ingrediente ativo	Nome comercial	Dose comercial	Quantidade de Cu ²⁺ na dose comercial	Quantidade de cobre aplicado (mg.L ⁻¹)
NP CuO, 40nm	Nanopartícula de CuO - US Research Nanomaterials, Inc.	200 mg.L ⁻¹	99,9%	200
Hidróxido de Cobre	Supera [®] Oxiquímica Agrociência LTDA.	12,85 mL.L ⁻¹	35%	4497
Óxido Cuproso	Big Red [®] Agrichem	1,25 mL.L ⁻¹	50%	625
Casugamicina	Kasumin [®] - UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S. A.	3 mL.L ⁻¹	---	---

Fonte: Autor (2021)

Utilizando-se o método de aspersão, a suspensão do inóculo foi pulverizada em ambos os lados das folhas, até o ponto de escorrimento e mantidas em câmara úmida por 48 horas após a inoculação dos isolados resistente e sensível. As irrigações foram realizadas a cada dois dias, bem como as avaliações dos sintomas da doença. (OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990)

Após o aparecimento dos primeiros sintomas, as avaliações foram realizadas nos dois primeiros pares de folhas verdadeiras, sendo quantificada a severidade da doença (percentual de área foliar lesionada), com intervalos de dois dias, utilizando-se a escala de notas proposta por Belan et al. (2014) (Tabela 3).

Tabela 3 Escala notas para a Mancha Aureolada do Cafeeiro

Nota	Grau de severidade (%)
0	0%
1	0,1-0,99%
2	1-2%
3	2,01-4%
4	4,01-8%
5	8,01-16%
6	16,01-25%
7	25,01-45%
8	≥ 45,1%

Belan et al. (2014)

Em cada parcela experimental, os dados de severidade ao longo do tempo foram usados para traçar a área a baixo da curva de progresso da doença (AACPD) e calcular a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), como proposto por Shaner & Finney (1977) conforme a equação 1.

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (T_{i-1} - T_i) \quad (1)$$

Em que:

AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença.

Y_i = proporção de doença na i -ésima observação.

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

n = número total de observações.

Para elucidar o resultado dos tratamentos será calculado a porcentagem de eficiência, corrigindo-se a AACPS pela fórmula de Abbott (1925) segundo a Equação 2.

$$E(\%) = \frac{T - T_r}{T} * 100 \quad (2)$$

Em que:

T = Testemunha, T_r = Tratamento.

4.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. Os pressupostos da análise de variância normalidade (Shapiro Wilk) e homogeneidade (Bartlett) foram verificados. Como os dados do experimento *in vitro* não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, os mesmos foram transformados. Utilizou-se a transformação $\sqrt{x} + 0,5$. O efeito das variáveis foi comparado (Teste F, $p < 0,05$) e quando significativo, as respectivas médias foram agrupadas (Teste de Scott-Knott, $p < 0,05$) ou comparadas por regressão. As análises foram submetidas utilizando o software R[®] (version 3.6.1) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da sensibilidade *in vitro* de diferentes isolados de *Psg in vitro* a NP CuO

Houve interação significativa ($p < 0,001$) entre isolados e doses de nanopartículas de cobre. Os isolados apresentaram comportamento diferente em cada dose da nanopartícula (Tabela 4). A dose 50 mg.L⁻¹ foi a mais eficaz na inibição do crescimento *in vitro* dos isolados UFLA 77 e UFLA 138, observando-se reduções de 32.04% e 11.27%, respectivamente, no número de colônias comparado à testemunha. Contudo, para os isolados UFLA 82 e UFLA 103, a dose de 100 mg.L⁻¹ foi a mais eficiente, com reduções de 17.02% e 5.24%. Para o isolado UFLA 52, a dose de 200 mg.L⁻¹ proporcionou a maior inibição, 38.04% (Figura 1).

Para o isolado UFLA 103 no tratamento com nanopartícula de cobre, mesmo com o aumento das doses de (0 a 400 mg.L⁻¹), não se observou redução significativa do número de colônias (Figura 2). Para os isolados UFLA 52, 77, 82, 103 e 138, a mínima concentração inibitória foi a dose 25 mg.L⁻¹, com redução de 7.24%, 15.85%, 9.05%, 0.37% e 0.80% respectivamente. Na dose 400 mg.L⁻¹ ocorreu a diminuição da toxicidade da NP CuO, com aumento no número de colônias em relação à dose anterior (200 mg.L⁻¹), para os isolados UFLA 52, UFLA 77, UFLA 82, UFLA 103 e UFLA 138 de 49.7%, 34.62%, 3.73%, 1,68% e 5,28% (Figura 1 e 2).

Para o isolado UFLA 82 na dose 50 mg.L⁻¹ da NP CuO, houve menor eficiência, com aumento do n° de colônias em 4.36% em relação à dose anterior (25 mg.L⁻¹). Para os isolados UFLA 77, UFLA 82 e UFLA 138, os números de colônias foram considerados semelhantes estatisticamente, nas dosagens de 25, 100 e 200 mg.L⁻¹ (Tabela 4).

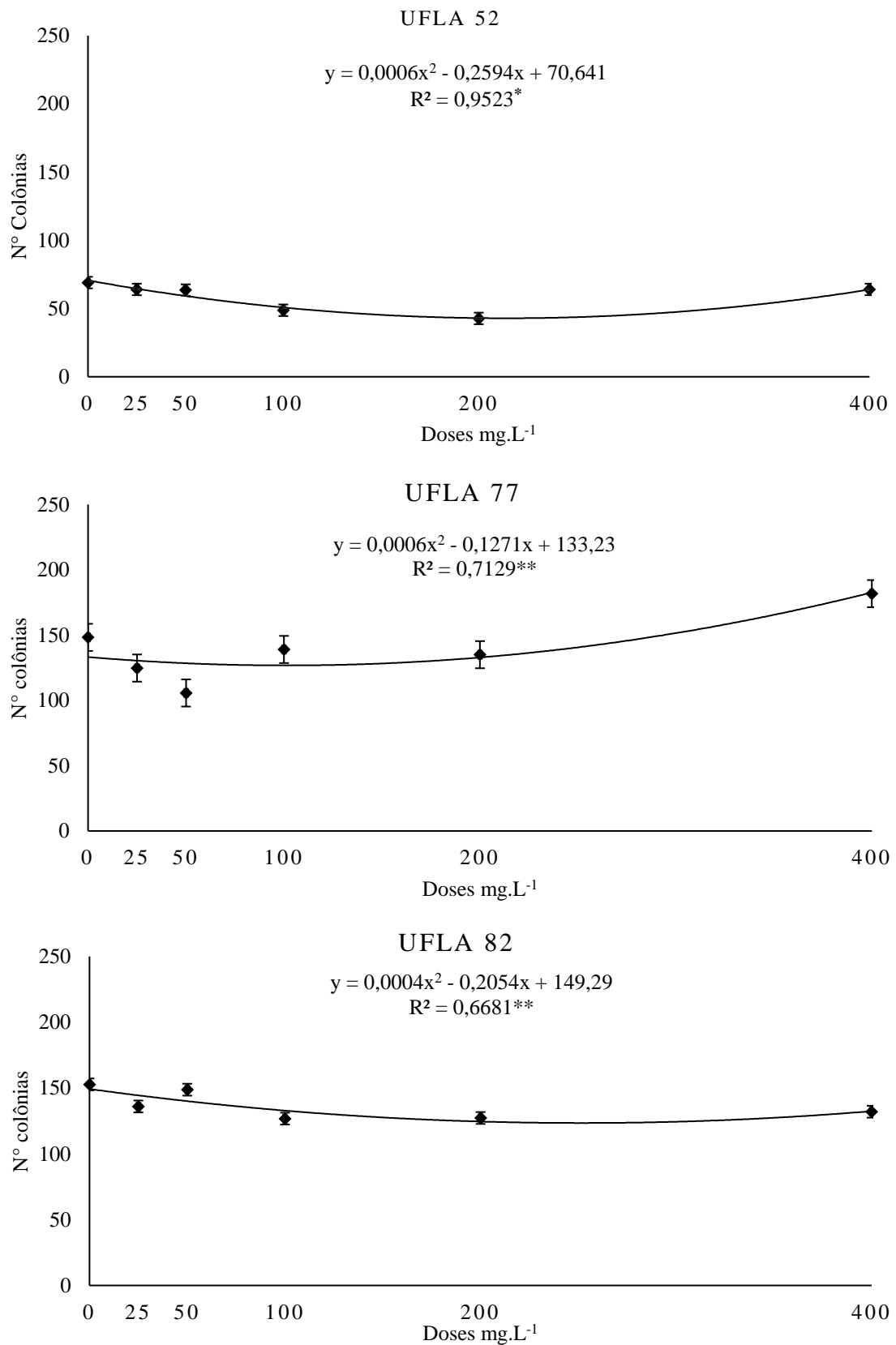
Tabela 4. Número de colônias de diferentes isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em diferentes doses da nanopartícula de óxido de cobre (NP CuO)

Doses ^{a,b/} Isolados	0	25	50	100	200	400
UFLA 52	8,80 d	8,49 c	8,46 e	7,47 c	7,03 c	8,49 e
UFLA 77	12,65 c	11,66 b	9,76 d	12,28 b	12,09 b	13,95 b
UFLA 82	13,36 b	12,15 b	12,68 b	11,74 b	11,76 b	11,98 d
UFLA 103	16,07 a	16,01 a	15,86 a	15,67 a	15,71 a	15,83 a
UFLA 138	12,37 c	12,27 b	11,36 c	12,45 b	12,40 b	12,72 c
CV (%)	4,08					

^aMédias seguidas da mesma letra em cada coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ^bDados transformados para raiz (x) + 0,5.

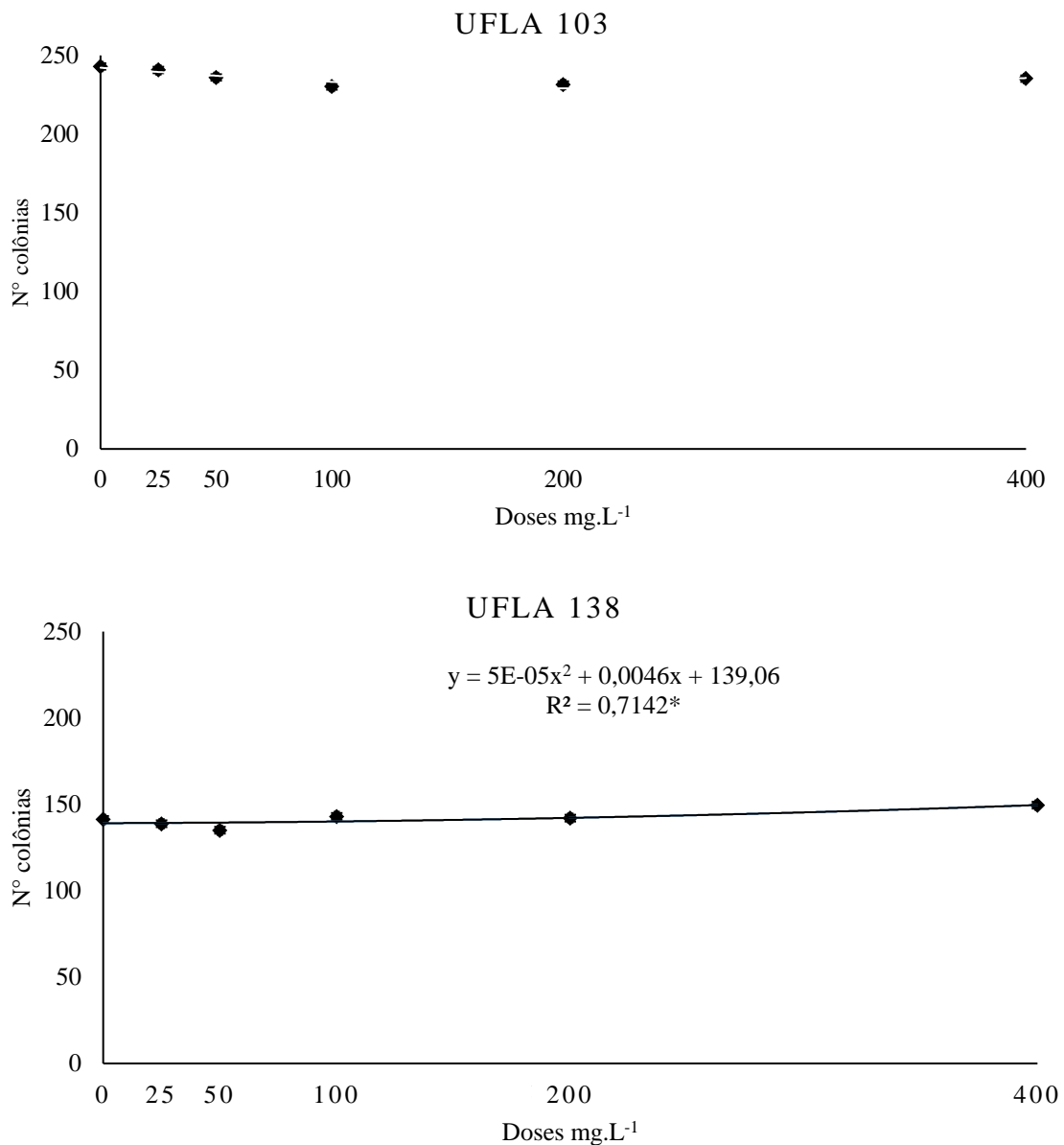
Fonte: Autor (2021)

Figura 1. Efeito da nanopartícula de óxido cobre (CuO), testados nas doses de 0, 25, 50, 100, 200, 400 mg.L⁻¹ no número de colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.



* Significativo a 5% de acordo com o teste F; ** Significativo a 0.1%
 Fonte: Autor (2021).

Figura 2. Efeito das nanopartículas de óxido cobre (CuO), testados nas doses de 0, 25, 50, 100, 200, 400 mg.L⁻¹ no número de colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*



* Significativo a 5% de acordo com o teste F; ** Significativo a 0.1%

Fonte: Autor (2021).

Os isolados UFLA 52 e 77 foram os mais sensíveis a NP CuO com inibições do crescimento *in vitro* acima de 30% nas doses de 200 e 50 mg.L⁻¹ respectivamente. Entretanto Yamada (2014) ao observar a sensibilidade de 33 isolados de Psg em concentrações de 0 a 20 mg.L⁻¹ do sulfato de cobre, verificaram que os isolados UFLA 52 e 77, não cresceram em concentrações superiores a 10 mg.L⁻¹ em microtubos contendo a suspensão bacteriana.

Os isolados Psg UFLA 82 e 138 quando expostos as NP CuO, as maiores inibições foram abaixo de 18% nas doses de 50 e 100 mg.L⁻¹. Enquanto Yamada (2014) relatou o não

crescimento desses isolados em concentrações superiores a 4 mg.L⁻¹ do sulfato de cobre. A divergência de sensibilidade dos mesmos isolados pode estar relacionada com as diferentes metodologias utilizadas nos dois trabalhos. De acordo com Griffin, Brown e Gambley (2018) pequenas variações na metodologia, como pH, meio de cultura e dosagem aplicada, afetam significativamente os resultados de sensibilidade *in vitro* ao cobre.

Segundo Gabal et al. (2018) as NPs CuO possuem uma ampla gama de aplicações como agentes bactericidas, fungicidas e antivirais, permitindo o seu emprego em diversos patossistemas. Strayer-Scherer et al. (2018) observaram maior eficiência de NP CuO nas doses de 100 e 200 mg.L⁻¹ em relação ao hidróxido de cobre convencional em taxas equivalentes no controle de *X. perforans in vitro*. As NPs CuO também podem ser utilizadas como alternativa no controle de fungos. De acordo Malandrakis, Kavroulakis e Chrysikopoulos, (2021) as NPs promoveram o controle *in vitro* de *Monilinia fructicola* resistente a benzimidazol (fungicida sistêmico) na dose de 252 mg.L⁻¹, enquanto que, para ter a mesma eficiência, foi utilizada a dose de 498 mg.L⁻¹ de hidróxido de cobre.

Entretanto, houve aumento do número de colônias para todos os isolados do experimento *in vitro*, na dose 400 mg.L⁻¹ em relação à dose anterior de 200 mg.L⁻¹ NP CuO, o que pode estar associado aos isolados possuírem algum mecanismo de resistência. Yamaha (2014) evidenciou a presença do gene *CopA*, que está relacionado à resistência das bactérias ao cobre, nos cinco isolados utilizados neste trabalho. A presença dessa região gênica está associada à transferência horizontal de genes e à variabilidade genética (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020).

Outras regiões gênicas também são responsáveis pela resistência ao cobre. Colombi et al. (2017), ao sequenciar o genoma de sete cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, verificaram que todos apresentaram genes de resistência em regiões variáveis de elementos integrativos e conjugativos (ICEs), sendo eles o *czc/cusABC* e sistema *copABCD*.

Os ICEs e os plasmídeos são semelhantes e ambos podem ser incorporados aos genes das bactérias por transferência horizontal (conjugação) ou transferência vertical, célula mãe para célula filha, conferindo sequências genômicas que proporcionam desintoxicação de monovalentes e cátions incluindo cádmio, cobre, prata e zinco (COLOMBI et al., 2017). Na literatura já existe relato de infecções mistas de *P. syringae* pv. *garcae* e *P. syringae* pv. *tabaci* em lavouras cafeeiras no estado do Paraná, o que pode contribuir para a diversificação genética por conjugação (RODRIGUES et al., 2017).

Marin et al. (2019) encontraram no Estado do Paraná isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) tolerantes, mas não resistentes ao cobre. Segundo os autores os

isolados tolerantes suportam concentrações intermediárias de cobre em relação aos isolados suscetíveis e resistentes. No entanto, nos isolados tolerantes há ausência dos genes *copLAB* ou *copABCD*, que estão presentes nos isolados resistentes ao cobre, e os grandes plasmídeos (c. ≥ 200 kb), que normalmente carregam esses genes. Os isolados tolerantes diferiram das suscetíveis pela maior expressão dos genes homólogos *cohA* e *cohB* na presença de cobre. Em *Pseudomonas syringae*, os genes *copABCD*, *cop A* e *cop C* codificam proteínas periplasmáticas que se ligam aos íons de cobre e são responsáveis por resistências parciais (COOKSEY, 1993).

Entre os isolados estudados UFLA 103 foi o mais resistente, com inibição de 5,2% na dose de 100 mg.L^{-1} , não diferindo significativamente o número de colônias entre as doses. Gutiérrez-Barranquero (2013) ao sequenciar em folhas de mangueira, os plasmídeos *pPT23A*, um grupo de plasmídeos amplamente distribuídos em *P. syringae* pv. *syringae*, constataram a presença dos genes *copABCD* e *cusABC*, juntamente com o gene *copG*, e esse arranjo genético confere maior resistência *in vitro* ao cobre em concentrações até quatro vezes maiores em relação aos outros isolados.

Desta forma, doses a partir 400 mg.L^{-1} podem não necessariamente fornecer maior controle *in vitro* do patógeno. Isolados de *Xanthomonas campestris* provenientes de gerânio exposta a nanopartículas de ferro zero-valente, tiveram a taxa de crescimento aumentada com o aumento das concentrações de 0 à 550 mg.L^{-1} (GHORBANI; MORADIAN; BIPARVA, 2018). Anjos (2020) ao avaliar a germinação *in vitro* de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa* em diferentes doses de NPs, observou na dose de 100 mg.L^{-1} efeito inibitório, diminuindo a germinação para 0,6%, e o aumento na germinação de até 40% na dose 400 mg.L^{-1} . Tal efeito pode estar relacionado ao processo de aglutinação e precipitação de íons Cu^{2+} com o meio de cultura, impedindo a atividade antifúngica.

Banik e Luque (2017) ao avaliarem o efeito da nanopartícula de cobre de 50 nm em *P. syringae* observaram que cobre em pequenas doses (50 e 100 mg.L^{-1}) promoveu o crescimento da bactéria em relação às placas controles (sem o nanometal). Segundo os autores, um dos fatores para esse aumento, seria o fato do tratamento controle ser deficiente em cobre, não promovendo o crescimento de todas as células bacterianas. O cobre nas bactérias está ligado à respiração e atividades enzimáticas, processos essenciais para o desenvolvimento bacteriano (ROMEIRO, 2001a).

Alguns estudos mencionam também a capacidade das bactérias manterem o equilíbrio das quantidades de cobre intracelular (homeostase) em contato com íons metálicos. De acordo com Arguello, Raimunda, Padilla (2013) as bactérias do gênero *Xanthomonas*, apresentam em

seus cromossomos o gene *cohLAB*, responsável por regular o equilíbrio celular e dar proteção às quantidades excessivas de metais nocivos ao patógeno.

Neste experimento, os isolados *P. syringae* pv. *garcae* UFLA 52, UFLA 77, UFLA 103 e UFLA 138 apresentaram redução no seu crescimento nas doses NPs CuO 25 e 50 mg.L⁻¹. Li, Yang e Cui (2017), testando nanopartículas óxido de cobre carregado com grafeno, observaram inibição de *P. syringae* pv. *tomato* em doses ainda menores 16 mg.L⁻¹. Varympopi et al. (2020) na busca por alternativas aos bactericidas convencionais, encontraram inibição do crescimento e ação bactericida *in vitro* nas doses de nanopartículas de cobre 800, 400, 150 e 1200 mg.L⁻¹, para *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Erwinia amylovora* e *Dickeya dadantii*.

As divergências encontradas na literatura em relação ao controle promovido por nanomateriais podem estar relacionadas às variáveis composição e estrutura da nanopartícula e gênero e espécie das estirpes patogênicas trabalhadas. Majumdar et al. (2019) testaram quatro tamanhos (18, 24, 28 e 33 nm) de nanopartículas de cobre no controle de *X. oryzae* e relataram atividade bactericida e bacteriostática, respectivamente, apenas nos tamanhos 28 nm e 33 nm.

Não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando nanopartículas de cobre no controle *in vitro* de bactérias causadoras de doenças no cafeeiro. Segundo Gkanatsiou et al. (2019) a sensibilidade aos nanometais pode variar dependendo da espécie bacteriana e concentração da suspensão.

Um dos grandes desafios de se usar nanometais, seria manter a estabilidade das nanopartículas contra a aglomeração, causada pelas forças de Van der Waals, que dificultam a liberação dos íons de cobre no meio de cultura. Outro fator seria a facilidade de oxidação do cobre em contato com oxigênio, o que pode afetar sua atividade antimicrobiana na aplicação (ISMAIL et al., 2021).

De acordo com Gkanatsiou et al. (2019) a atividade antibacteriana e efetividade das NPs CuO vai além da composição, estrutura, tamanho e depende fortemente da capacidade de liberação dos íons metálicos afim de interagir com as células do patógeno. Os testes *in vitro* nos permitem inferir que os isolados testados apresentam distinção entre eles, em relação à sensibilidade às diferentes concentrações de NPs CuO 40 nm.

Sendo assim, tornam-se necessários estudos moleculares para se verificar a presença dos genes responsáveis por atribuir diferentes níveis de sensibilidade a nanopartícula de cobre nos isolados de Psg em Minas Gerais, bem como determinar os mecanismos predominantes. Na literatura encontra-se diferentes metodologias para se avaliar a sensibilidade ao cobre *in vitro* de bactérias. A padronização é necessária, pois variáveis como meio cultura, pH e o

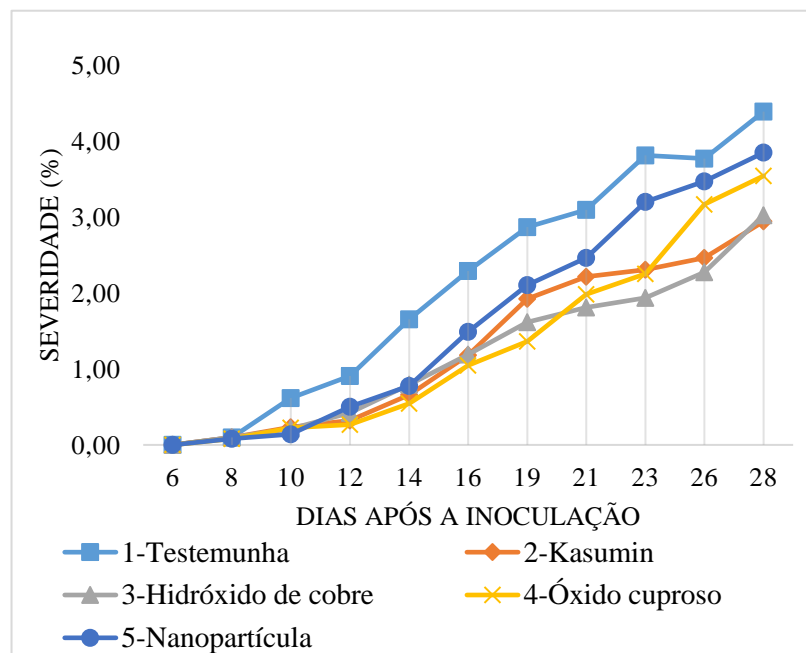
método de quantificação da população bacteriana, podem dificultar a comparação entre estudos com nanopartículas.

5.2 Nanopartículas de CuO no controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro

Para o experimento *in vivo*, foram selecionados os isolados *P. syringae* pv. *garcae* UFLA 103, resistente às doses (0 a 400 mg.L⁻¹) da nanopartícula de cobre, e UFLA 52, com sensível na dose 200 mg.L⁻¹, de acordo com os testes *in vitro* (Figura 3 e 4).

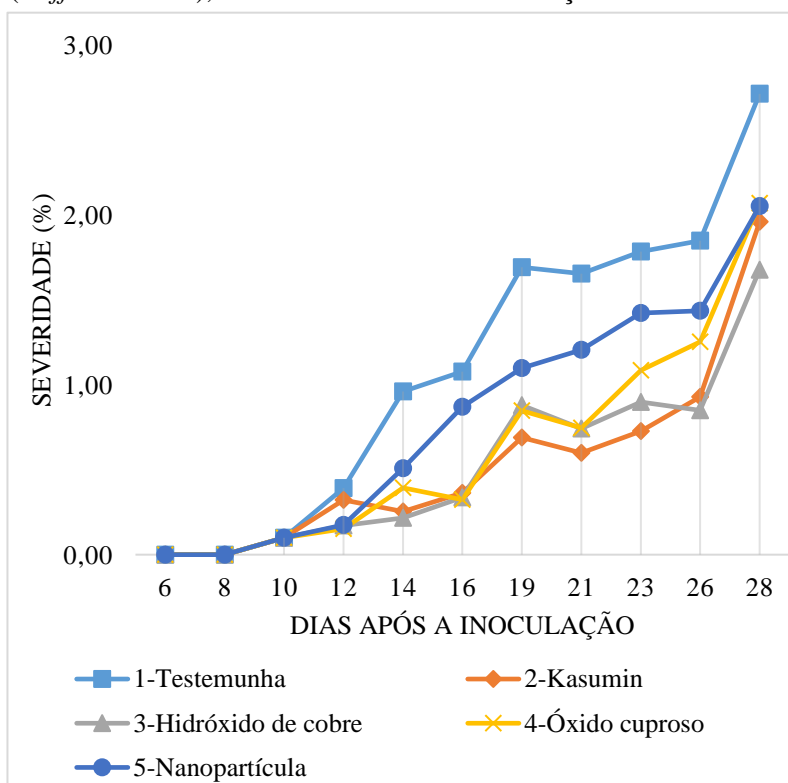
Nos experimentos em câmara de crescimento, não houve diferença significativa para a interação isolado x produto, entretanto, a área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha aureolada (AACPDS) diferiu significativamente ($p < 0,000$) para todos os tratamentos propostos, que tiveram AACPDS menores que a testemunha (Figura 3 e 4).

Figura 3 - Curva de progresso da severidade da Mancha Aureolada do Cafeeiro, isolado UFLA 103 – (Resistente), em folhas, na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*), nas diferentes datas de avaliações.



Fonte: Dados do autor (2021).

Figura 4 - Curva de progresso da severidade da Mancha Aureolada do isolado UFLA 52 (Sensível), em folhas, na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*), nas diferentes datas de avaliações.



Fonte: Dados do autor (2021).

Para o isolado UFLA 103 os sintomas da doença foram observados aos 8 dias após a inoculação, com o máximo de 42.60 para a AACPDS (Figura 3). O tratamento hidróxido de cobre apresentou a AACPDS 23.72 e a redução da doença de 44,32% (Tabela 5 e 6). O óxido cuproso e casugamicina com AACPDS de 25.40 e 25.74, com eficiência no controle da Mancha Aureolada de 40,38% e 39,57% respectivamente. Para a nanopartícula de cobre observou-se redução de 24,21% em relação à testemunha, com índice da AACPDS de 32.29. Os produtos utilizados apresentaram controle semelhante, quando as plantas foram inoculadas com o isolado resistente ao cobre. Entretanto a dose utilizada é 22 vezes menor em relação ao hidróxido de cobre e 3,2 vezes inferior ao óxido cuproso.

Para o isolado UFLA 52 foi observada a severidade da doença após 10 dias da inoculação, com o máximo de 21.74 para a AACPDS (Figura 4). O tratamento casugamicina (antibiótico) teve maior controle, com índice da AACPDS de 9.93 e uma eficiência em relação a testemunha de 54.31% (Tabela 7 e 8). Seguidos do hidróxido de cobre e óxido cuproso com AACPDS de 10.07 e 11.88 e redução em relação a testemunha de 53,67% e 45,36% respectivamente. O menor controle da doença foi observado para a nanopartícula de cobre, com AACPDS de 15.69 e eficiência de 27,82% no controle da Mancha Aureolada.

Tabela 5 – Severidade em porcentagem (%) dos sintomas causados por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* – (UFLA 103) em folhas de cafeeiro (*C. arabica*) em função da nanopartícula CuO e produtos comerciais aplicados

Tratamento / Dias após inoculação	06 DAI	08 DAI	10 DAI	12 DAI	14 DAI	16 DAI	19 DAI	21 DAI	23 DAI	25 DAI	27 DAI	AACPS
Testemunha	0,00 a	0,10 a	0,62 a	0,90 a	1,64 a	2,29 a	2,86 a	3,09 a	3,81 a	3,77 a	4,38 a	42,60 a
Casugamicina	0,00 a	0,10 a	0,23 b	0,32 b	0,65 b	1,18 b	2,02 b	2,21 a	2,30 a	2,46 a	2,94 a	25,74 b
Hidróxido de Cobre	0,00 a	0,08 a	0,22 b	0,42 b	0,77 b	1,19 b	1,61 b	1,80 a	1,93 a	2,27 a	3,02 b	23,72 b
Óxido Cuproso	0,00 a	0,08 a	0,21 b	0,27 b	0,54 b	1,18 b	1,36 b	1,98 a	2,25 a	3,17 a	3,54 b	25,40 b
NP CuO	0,00 a	0,08 a	0,14 b	0,50 b	0,77 b	1,05 b	2,10 b	1,46 a	3,20 a	3,26 a	3,84 b	32,29 b
CV (%)	0,00	26.62	52.59	43.65	27.40	36.55	34.47	31.34	38.91	27.75	11.55	20,32

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas colunas por teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); DAI: Dias após a inoculação
Fonte: Dados do autor (2021).

Tabela 6 - Eficiência dos tratamentos (%) no controle da severidade dos sintomas causados por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* isolado UFLA 103

Tratamento / Dias após inoculação	6 DAI E (%)	8 DAI E (%)	10 DAI E (%)	12 DAI (E%)	14 DAI (E%)	16 DAI E (%)	19 DAI E (%)	21 DAI E (%)	23DAI E (%)	25 DAI E (%)	27 DAI E (%)	AACPS E (%)
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casugamicina	0,00	0,00	62,03	64,53	60,09	48,44	32,95	28,45	39,50	34,63	32,96	39,57
Hidróxido de cobre	0,00	0,00	65,62	53,23	51,94	48,13	43,72	41,47	49,23	39,71	31,13	44,32
Óxido de Cuproso	0,00	20,0	63,74	70,31	66,87	54,26	52,48	35,91	40,96	15,97	19,29	40,38
Nanopartícula	0,00	20,0	77,04	44,42	53,00	35,03	26,64	20,43	16,10	7,97	12,32	24,21

Fonte: Dados do autor (2021).

Tabela 7 – Severidade em porcentagem (%) da *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae* UFLA 52, em folhas de cafeeiro (*C. arabica*) em função da nanopartícula CuO e produtos comerciais aplicados

Tratamento / Dias após inoculação	08 DAI	10 DAI	12 DAI	14 DAI	16 DAI	19 DAI	21 DAI	23 DAI	25 DAI	27 DAI	AACPS
Testemunha	0,00 a	0,10 a	0,39 a	0,96 a	1,08 a	1,69 a	1,65 a	1,79 a	1,85 a	2,72 a	21,74 a
Casugamicina	0,00 a	0,10 a	0,32 a	0,25 b	0,36 b	0,69 b	0,60 c	0,73 b	0,93 b	1,96 b	9,93 c
Hidróxido de Cobre	0,00 a	0,10 a	0,17 b	0,22 b	0,34 b	0,88 b	0,74 c	0,90 b	0,85 b	1,68 b	10,07 c
Óxido Cuproso	0,00 a	0,10 a	0,15 b	0,39 b	0,32 b	0,85 b	0,75 c	1,08 b	1,25 b	2,07 b	11,88 c
NP CuO	0,00 a	0,10 a	0,17 b	0,50 b	0,87 a	1,10 b	1,20 b	1,42 a	1,43 a	2,05 b	15,69 b
CV (%)	0,00	0,00	53,62	46,85	34,89	42,64	26,55	35,26	27,26	21,25	21,65

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si nas colunas por teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); DAI: Dias após a inoculação

Fonte: Dados do autor (2021).

Tabela 8 - Eficiência dos tratamentos (%) no controle da severidade dos sintomas causados por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* isolado UFLA 52

Tratamento / Dias após a inoculação	8 DAI E (%)	10 DAI E (%)	12 DAI (E%)	14 DAI (E%)	16 DAI E (%)	19 DAI E (%)	21 DAI E (%)	23 DAI E (%)	25 DAI E (%)	27 DAI E (%)	AACPS E (%)
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casugamicina	0,00	0,00	17,52	73,60	66,26	59,20	63,78	59,31	49,72	27,79	54,31
Hidróxido de cobre	0,00	0,00	56,22	77,50	68,78	48,03	55,09	49,62	53,99	38,17	53,67
Óxido de Cuproso	0,00	00,0	61,15	59,02	69,96	49,85	54,90	39,24	32,18	23,75	45,36
NP CuO	0,00	00,0	55,46	47,02	19,32	35,10	27,05	20,30	22,28	24,36	27,82

Fonte: Dados do autor (2021).

Todos os tratamentos foram eficazes em reduzir a severidade da Mancha Aureolada do Cafeeiro para ambos isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*: UFLA 52 e UFLA 103. Óxido cuproso e hidróxido de cobre aplicados nas doses de 625 e 4497 mg.L⁻¹ respectivamente, apresentaram os melhores resultados na redução da severidade da doença, com eficiência acima de 40% em relação ao tratamento controle. Freitas (2017) relatou eficiência de 87% dos defensivos cúpricos no controle da Mancha Aureolada, nas concentrações de 2500 mg.L⁻¹.

Patrício et al. (2012) também observaram controle acima de 78% da severidade da doença em relação a testemunha, ao aplicar 1050 mg.L⁻¹ de hidróxido de cobre e óxicloreto de cobre. Ou seja, produtos à base de cobre em diferentes concentrações podem reduzir a gravidade de Mancha Aureolada do Cafeeiro. As diferentes condições durante a execução do experimento como cultivar, isolado Psg, temperatura, umidade relativa e tempo de inoculação após aplicação dos tratamentos, podem explicar a diferença da eficácia das mesmas formulações.

A AACPD da Mancha Aureolada diferiu significativamente da testemunha, ao aplicar NP CuO, com eficiência no controle de 24,21% e 27,82%, em mudas inoculadas com os isolados Psg UFLA 103 e UFLA 52, respectivamente. Os resultados corroboram com a redução da severidade no experimento *in vitro*. A aplicação de 200 mg.L⁻¹ da NP CuO foi 3,2 e 22 vezes menor em comparação ao óxido cuproso e hidróxido de cobre no experimento em mudas de cafeeiro. Resultados semelhantes foram encontrados por Gkanatsiou (2019), que relatou a inibição da *P. syringae* resistente a refampicina (antibiótico), em plantas de feijão utilizando nanocobre na dose 200 mg.L⁻¹, dosagem cinco vezes menor do que a registrada para Kocide[®] (hidróxido de cobre).

Para os isolados UFLA 52 e 103 as maiores reduções de severidade foram de 44,32% e 54,31% respectivamente, ao se aplicar os produtos comerciais hidróxido de cobre e casugamicina. Contudo, alguns autores obtiveram melhores resultados com a aplicação de nanocobre no controle de outras doenças bacterianas. QIAO et al. (2020) ao aplicar CuO NP em mudas de tomate inoculadas com *Xanthomonas perforans*, verificaram redução da severidade em 61,7% e 64,6%, após serem pulverizadas na concentração de 153.6 mg.L⁻¹. Strayer-Scherer et al. (2018) avaliaram o efeito das NP CuO e o produto comercial Kocide[®] 3000 (hidróxido de cobre), em mudas de tomate inoculadas com *X. perforans* tolerantes a cobre e observaram que o nanometal nas dosagens de 100, 500 e 1000 mg.L⁻¹, apresentaram supressão significativa da doença em comparação à testemunha. O Kocide[®] embora tenha apresentado o mesmo resultado, a redução significativa da severidade só ocorreu na dose 1000 mg.L⁻¹. Chen

et al. (2019) ao testarem nanometais de óxido de cobre em plantas de tabaco inoculadas com *Ralstonia solanacearum*, observaram que em concentrações de 50, 100 e 250 mg.L⁻¹, houve reduções da severidade de 74.2%, 62.2% e 38.1% respectivamente.

O hidróxido de cobre e NP Cu em dosagens de 4497 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹ respectivamente, foram semelhantes no controle da Mancha Aureolada (Psg UFLA 103). Alguns trabalhos apresentaram resultados semelhantes para os outros tratamentos, em concentrações mais inferiores de NP CuO. Li, Yang e Cui (2017) observaram redução significativa da severidade da Pinta Bacteriana do Tomateiro em relação à testemunha, ao aplicar 8 mg.L⁻¹ da NP CuO. Comparativamente, para o produto comercial hidróxido de cobre atingir efeitos semelhantes foram necessários dosagens de 125 e 250 mg.L⁻¹.

São vários os mecanismos pelos quais o cobre está envolvido no controle de fitobactérias. A aplicação preventiva de cúpricos tem por finalidade, formar uma camada protetora nas folhas e proporcionar a liberação de Cu²⁺. Os Cátions penetram a parede celular o que causa instabilidade em suas moléculas e mutações no DNA (RODRIGUES, 2006). O cobre na sua forma iônica forma complexos com sulfidrilas, hidroxilas e carboxilas, inativando grupos sulfidrílicos como a catalase, sacarase, arginase, beta-glucosidade e asparaginase. Este somatório de reações desencadeia a degradação da célula bacteriana, entretanto a morte do patógeno não é generalizada, algumas bactérias paralisam o seu desenvolvimento enquanto houver a presença do cobre na superfície foliar (ORDAX et al., 2006). Na presença do cobre as células bacterianas possuem em sua membrana plasmática cuproenzimas e cuproproteínas, que mantem as quantidades adequadas (homeostase) de cobre dentro de suas células (ANDREI et al., 2020).

Outra forma de proteção, são que as populações bactérias produzem mucilagens (biofilme) que inibem fatores antimicrobianos extrínsecos como elementos metálicos e luz ultravioleta. (BOGINO et al., 2013). Contudo Chen, Mao e Ding (2019) ao estudarem os mecanismos antibacterianos de nanopartícula de óxido de cobre, em *R.solanacearum*, observaram inibição significativa de 35 a 37 % do biofilme em 24 horas. O biofilme permite que as bactérias troquem água e nutrientes, contribui para a comunicação intercelular “quorum sensing” e virulência de bactérias fitopatogênicas (BOGINO et al., 2013).

Alguns autores relataram outros efeitos antibacterianos afim de esclarecer a interação planta, patógeno e o nanocobre. Segundo Mondal e Mani (2014), investigando as propriedades antibacterianas do NP Cu no controle de *X. axonopodis* pv. *punicae*, observaram em análise

espectrofotometria eletrônica que a parede celular interage com as nanometais, de tal forma que ocorre o rompimento da superfície célula bacteriana.

Banik e Luque (2017) observaram que os íons do cobre se aderem com facilidade a parede celular de *P. syringae*, devido ser uma bactéria Gram negativa, o que ocasiona em certa reação de redução. Li, Yang e Cui (2017) ao analisarem a estrutura de células de *P. syringae* pv. *tomato*, após a exposição a nanocobre revestidas com grafeno, observaram os efeitos mais precisos do metal na parede celular, local que ocorreu mudanças da permeabilidade no interior celular e desorganização das organelas.

Além dos efeitos diretos na superfície bacteriana é relatado um aumento considerável de espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento excessivo de superóxido (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intercelular, leva a falha do sistema de metabolização que dá origem a um forte ambiente oxidativo, ocasionando danos aos lipídios da membrana, proteínas e DNA (LI; YANG; CUI, 2017). Além do mais, foi observado por Chen, Mao e Ding (2019), a capacidade das nanopartículas de cobre inibirem a expressão de genes associados ao deslocamento de bactérias de plantas. Os autores observaram redução dos genes *flgM* e *flaA* que são envolvidos na motilidade bacteriana.

Além dos mecanismos mencionados, há trabalhos que procuram elucidar a capacidade dos nanometais de cobre na expressão de genes relacionados a defesa vegetal. Ma et al. (2019) ao testar nanopartículas de cobre afim suprimir uma doença causada por *F. oxysporium* f. sp. *lycopersici* em tomate, observaram aumento significativo na expressão de genes de defesa, *PPO*, *PTI5* e *PR1A1*, sendo todos regulados positivamente.

Observou-se neste trabalho, efeitos inibitórios *in vitro* em todos os isolados até a dose 200 mg.L^{-1} da NP Cu. Para o teste *in vivo* os resultados foram satisfatórios para o controle da isolado resistente, com semelhança significativa aos produtos registrados para a doença. Vale ressaltar ainda que, a dosagem cobre metálico aplicada nas mudas de café, foi 22 vezes menor em relação ao Supera[®] (Hidróxido de Cobre) e 3,2 vezes inferior que o produto Big Red[®] (Óxido Cuproso).

As nanopartículas por serem mais reativas proporcionam aplicações no campo em menores concentrações, o que gera potencial para o uso numa agricultura mais sustentável. A utilização dos nano-defensivos no manejo de doenças contribui para que os produtores consigam se adequar às regulamentações impostas por alguns países. De acordo com Lamichhane et al., (2018) a União Europeia (UE) possui legislação (leg. 473/2002) que impõem

a redução gradativa do uso de cobre ao longo dos anos, afim de prevenir possíveis problemas de saúde pública e acúmulo de resíduos no meio ambiente. Além da UE, Austrália e Estados Unidos limitam a aplicação na agricultura orgânica e alguns autores já preveem que o seu uso pode ser banido em um futuro próximo (TAMM; PERTOT; GUBLER, 2015; LAMICHHANE et al., 2018).

A recomendação de NP CuO no controle da PSG ainda precisa de maiores estudos, afim de elucidar as melhores formas de aplicação para seu melhor aproveitamento, que acarretem o menor possível de impacto no ambiente, bem como saber qual a realidade das fitobactérias encontradas no campo em relação a suscetibilidade ao cobre. Apesar do uso das NP CuO ser pouco conhecido na cultura do cafeeiro, o uso em áreas de produções deve ser incentivado, afim de observar sua eficiência no controle de doenças, fisiologia da planta e produtividade.

6 CONCLUSÃO

As Nanopartículas NP CuO promoveram maior efeito antibacteriano *in vitro* até a dose de 200 mg.L⁻¹, para todos os isolados de *P. syringae* pv. *garcae* testados.

Os produtos comerciais e as Nanopartículas CuO reduziram a área abaixo da curva de progresso da severidade da Mancha Aureolada do Cafeeiro para o isolado *P. syringae* pv. *garcae* UFLA 103.

A NP CuO na dose de 200 mg.L⁻¹ é 3,2 e 22 vezes inferiores as dosagens de óxido cuproso e hidróxido de cobre, respectivamente, no controle da Mancha Aureolada do Cafeeiro e foi tão eficientes quanto esses produtos no controle da doença.

7 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** Journal of Economy Entomology, Lanham, 1925. v. 18, p. 265-267.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, 1956. v. 23, p. 151-155.
- ALVES, B. **Qualidade e comercialização de café.** Ouro Preto do Oeste: Emater - Ro, 2011. p. 19.
- ANJOS, R. M. **Nanopartículas no controle da vassoura de bruxa do cacauero.** 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
- ANDREI, A.; ÖZTÜRK, Y.; KHALFAOUI-HASSANI, B.; RAUCH, J.; MARCKMANN, D.; TRASNEA, P. I.; KOCH, H. G. (2020). **Cu Homeostasis in Bacteria: The Ins and Outs.** Membranes, 2020, v. 10, n. 9, p. 242.
- ARGUELLO, J. M.; RAIMUNDA, D.; PADILLA-BENAVIDES, T. (2013). **Mechanisms of copper homeostasis in bacteria.** Frontiers in cellular and infection microbiology, 2013. v. 3, p. 73.
- BALLIO, A.; BARRA, D.; BOSSA, F.; COLLINA, A.; GRGURINA, I.; MARINO, G.; SIMMACO, M. **Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of Pseudomonas syringae pv. syringae.** FEBS Letters, Roma, 1991. v. 291, n. 1, p. 109-112.
- BALARDIN, R. S. et al. **Mancozeb: muito além de um fungicida.** Porto Alegre: Bookman, 2017, 58 p.
- BANIK, S.; LUQUE, A. P. **In vitro effects of copper nanoparticles on plant pathogens, beneficial microbes and crop plants.** Spanish journal of agricultural research, 2017. v. 15, n. 2, p. 23.
- BANIK, S.; SHARMA, P. **Plant pathology in the era of nanotechnology.** Indian Phytopathol, 2011. v. 64, n. 2, p. 120-127.
- BARTA, T. M.; WILLIS, D. K. **Biological and molecular evidence that Pseudomonas syringae pathovars coronafaciens, striafaciens and garcae are likely the same pathovar.** Journal of phytopathology, 2005. v. 153, n. 7-8, p. 492-499.
- BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. **Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to Xanthomonas citri subsp. citri.** European Journal of Plant Pathology, n. 133(4), p. 949-963. 2012.
- BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. **Diversity and copper resistance of Xanthomonas affecting citrus.** Tropical Plant Pathology, 1-13. 2020.

BELASQUE, J.; BEDENDO, I. P. Bactérias Fitopatogênicas: Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. Cap. 9, p. 143-156.

BELAN, L.L.; POZZA, E.A.; FREITAS, M.L.O.; SOUZA, R.M.; JESUS JUNIOR, W.C.; OLIVEIRA, J.M. **Diagrammatic Scale for Assessment of Bacterial Blight in Coffee Leaves**. Journal of Phytopathology, v.162, p.801-810, 2014.

BELAN, L. L.; POZZA, E. A. ; FREITAS, M. L. O. ; ALVES, M. C. **Distribuição espacial da mancha aureolada em mudas de cafeeiro no viveiro**. In: 48º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2015, São Pedro SP. Anais 48º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - 2015. v. 1. p. 1.

BELAN L. L.; POZZA, E. A.; FREITAS, M. L. DE OLIVEIRA; RAIMUNDI, M. K. ; SOUZA, R. M. ; MACHADO, J. C. **Occurrence of Pseudomonas syringae pv. garcae in coffee seeds**. Australian Journal of Crop Science, v. 10, p. 1015- 1021, 2016

BELAN, L.L.; POZZA, E. A.; SOUZA, R.M. A Mancha Aureolada do Cafeeiro. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.22, p.227-256, 2014.

BLISKA, F. M. M.; BLISKA JÚNIOR, A.; PARTELLI, F. L.; FAZUOLI, L. C. A **importância de se explorar novos materiais genéticos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, Franca SP.: Embrapa Café, 2018. (CD-ROM), p. 2.

BOGINO, P. C.; OLIVA, M. D. L. M.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. **The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations**. International journal of molecular sciences, 2013, v. 14, n. 8, p. 15838-15859.

BORGATTA, J.; MA, C.; HUDSON-SMITH, N.; ELMER, W.; PLAZA PEREZ, C. D.; DE LA TORRE-ROCHE, R.; HAMERS, R. J. **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, n. 11, p. 14847-14856, 2018.

BRUNETTO, G.; SCHMITT, D. E.; COMIN, J. J.; MIOTTO, A.; DE MORAES, M. P.; HEINZEN, J. **Frações de cobre e zinco em solos de vinhedos no Meio Oeste de Santa Catarina**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi, 2014. v. 18, n. 8.

CARDOSO, R. M. L.; SERA, T. **Obtenção de cultivares de Coffea arabica L. com Garcae no Estado do Paraná**. In: SIMPÓSIO SOBRE FERRUGENS DO CAFEIEIRO, 1983, Oeiras. Resumos... Lisboa: CIFC, 1983. p. 417-419.

CARDUCCI, F. C.; SANTOS, W. G.; PEREIRA, C. T. M.; HOLDERBAUM, M. M.; BAGATIN, A. K.; MARIUCCI JÚNIOR, V. **Resistência à mancha aureolada de**

cultivares de café arábica em condições de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Brasília, DF: Embrapa Café, 2017. (CD-ROM), p. 2.

CARVALHO, V.L.; CHALFOUN, S.M. **Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro.** Informe Agropecuário, v.19, p.27-35, 1998.

CECAFÉ - CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL (Brasil). Relatório Mensal Agosto 2021. 2021. Disponível em: <https://www.cecafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes/> . Acesso em: 21 set. 2021

COLOMBI, E.; STRAUB, C.; KÜNZEL, S.; TEMPLETON, M. D.; MCCANN, H. C.; RAINEY, P. B. **Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids.** Environmental microbiology, v. 19, n. 2, p. 819-832, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de café: Primeiro levantamento | JANEIRO 2021.** 5. ed. Brasília Df: Observatório Agrícola, 2021. p. 16-38.

COOKSEY, D. A. **Copper uptake and resistance in bacteria.** Molecular microbiology, v. 7, n. 1, p. 1-5, 1993.

CHEN, Z. Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *C. gloeosporioides* isolated from coffee berries. **PhD Thesis.** Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 2002.

CHILLAPPAGARI, S.; SEUBERT, A.; TRIP, H.; KUIPERS, O. P.; MARAHIEL, M. A.; MIETHKE, M. **Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*.** Journal of bacteriology, 2010, v. 192, n. 10, p. 2512-2524.

DIXON, D. P.; CUMMINS, I.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. **Glutathione-mediated detoxification systems in plants.** Current opinion in plant biology, 1998. v. 1, n. 3, p. 258-266.

ELKINS, R. B.; TEMPLE, T. N.; SHAFFER, C. A.; INGELS, C. A.; LINDOW, S. B.; ZOLLER, B. G.; JOHNSON, K. B. **Evaluation of dormant-stage inoculum sanitation as a component of a fire blight management program for fresh-market Bartlett pear.** Plant disease, 2015. v. 99, n. 8, p. 1147-1152

FAQUIN, V. **NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS.** Lavras: Centro de Editoração/faepe, 2005. p. 186.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE - FRAC. **Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action.** [S.l.: s.n.], 2021. Disponível em: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2 . Acesso em: 11 Jun. 2021.

FREITAS, M. L. O. **Epidemiologia e controle da mancha aureolada do cafeeiro: Copper formulations in bacterial blight control and toxic effects on coffee seedlings.** 2017. 92 f. Tese

(Doutorado) - Curso de Agronomia/fitopatologia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

GARCIA, A. Fungicidas I: **utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos**. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 1999. 32p. (EMBRAPA-CPAF Rondônia. Documentos, 46).

GABAL, E.; RAMADAN, M. M.; ALGHUTHAYMI, M. A.; ABD-ELSALAM, K. A. **Copper nanostructures applications in plant protection**. In: Nanobiotechnology Applications in Plant Protection. Springer, Cham, 2018. p. 63-86.

GHORBANI, R.; MORADIAN, F.; BIPARVA, P. **Assessment of Different Antibacterial Effects of Fe and Cu Nanoparticles on Xanthomonas campestris Growth and Expression of Its Pathogenic Gene hrpE**. Journal of Agricultural Science and Technology, 2018. v. 20, n. 5, p. 1059-1070.

GKANATSIU, C., KARAMANOLI, K., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U., & DENDRINOUSAMARA, C. **Composition effect of Cu-based nanoparticles on phytopathogenic bacteria. Antibacterial studies and phytotoxicity evaluation**. Polyhedron, Tessalônica, 2019. v. 170, p. 395-403.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J. et al. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. 2. ed. Madison: SSSA, 1991. p. 329-370

GUIMARÃES, P. T. G.; GOMES, C. A.; CARVALHO, G. R.; CARVALHO, A. M. de, BOTELHO, C. E.; ANDRADE, V. T. **Uso do cobre na cafeicultura**. Belo Horizonte: Epamig, p. 4, (Circular Técnica 117), 2011.

GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A., DE VICENTE, A., CARRIÓN, V. J., SUNDIN, G. W., & CAZORLA, F. M. **Recruitment and rearrangement of three different genetic determinants into a conjugative plasmid increase copper resistance in Pseudomonas syringae**. Applied and environmental microbiology, 2013, v. 79, n. 3, p. 1028-1033.

GRIFFIN, K.; BROWN, P.; GAMBLEY, C. **Media pH and media type can significantly affect the reliability of in vitro copper tolerance assessments of Pseudomonas syringae pv. tomato**. Journal of applied microbiology, 2018, v. 125, n. 1, p. 216-226.

HONÓRIO, A. P.; GOULART, R. R.; BAQUIÃO, E. M. **Effect of Bayfolan® copper on the control of Pseudomonas syringae pv. garcae in vitro**: Revista Agrogeoambiental, Pouso Alegre, v. 11, n. 4, p. 2-9, dez. 2019.

ISMAIL, N. A.; SHAMELI, K.; ALI, R. R.; SUKRI, S. N. A. M.; ISA, E. D. M. **Copper/Graphene Based Materials Nanocomposites and Their Antibacterial Study: A Mini Review**. Journal of Research in Nanoscience and Nanotechnology, 1(1), 44-52, 2021.

CHEN, J.; MAO, S.; XU, Z.; DING, W. **Various antibacterial mechanisms of biosynthesized copper oxide nanoparticles against soilborne *Ralstonia solanacearum***. RSC advances, v. 9, n. 7, p. 3788-3799, 2019.

KADO, C. & HESKETT, M. **Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas***. Phytopathology. v. 60, p. 969-976. 1970.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. **Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin**. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, United States of America, 1954. v. 44, n. 2, p. 301-307.

KOROBKO, A.; WONDINAGEGNE, E. Bacterial blight of coffee (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in Ethiopia. In: **Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens**. Springer Netherlands, 1997. p. 538-541.

LAMICHHANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F., KÖHL, J.; JONES, J. B.; AUBERTOT, J. N. (2018). **Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture**. A review. Agronomy for Sustainable Development, 2018. v. 38, n. 3, p. 28.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. **A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas**. Journal of Applied Microbiology, Oxford, 1966. v. 29, n. 3, p. 470-489.

LI, Y.; YANG, D.; CUI, J. **Graphene oxide loaded with copper oxide nanoparticles as an antibacterial agent against *Pseudomonas syringae* pv. tomato**. RSC Advances, 2017. v. 7, n. 62, p. 38853-38860.

LOPES, M. V.; JUNIOR, J. P.; FONSECA, A. E. **Fungicidas cúpricos: definição, classificação, modo de ação e importância na cultura do cafeeiro**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Franca. Anais Brasília, DF: Embrapa Café, (1 CD-ROM), 2018. 1 p.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola***. 2002. 125 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2002.

MA, C.; BORGATTA, J.; DE LA TORRE ROCHE, R.; ZUVERZA-MENA, N.; WHITE, J. C.; HAMERS, R. J.; ELMER, W. **Time-dependent transcriptional response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to Cu nanoparticle exposure upon infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019.

MAJUMDAR, T. D.; SINGH, M.; THAPA, M.; DUTTA, M.; MUKHERJEE, A.; GHOSH, C. K. **Size-dependent antibacterial activity of copper nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* – A synthetic and mechanistic approach**. Colloid and Interface Science Communications, 2019, v. 32, p. 100-190.

MALANDRAKIS, A.; KAVROULAKIS, N.; CHRYSIKOPOULOS, C. V. **Copper nanoparticles against benzimidazole-resistant *Monilinia fructicola* field isolates**. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, v. 173, p. 104-796.

MANNING, M. E.; DANSON, E. J.; CALDERONE, C. T. **Functional characterization of the enzymes TabB and TabD involved in tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas syringae***. Biochemical and biophysical research communications, 2018. v. 496, n. 1, p. 212-217.

MARCOLINO, E. **Determinação do intervalo da aplicação de produtos cúpricos a inoculação de *Hemileia vastatrix* em mudas de cafeeiro**. 2019. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia/Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 3. ed. Recife: EDUFRPE, 2016. 234p.

MARIN, T. G. S.; GALVANIN, A. L.; LANZA, F. E.; BEHLAU, F. **Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains**. Plant Pathology, 68(6), 1088-1098. 2019

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London, Academic Press, 2012. p. 651.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações**. Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento, Brasília, DF (Brasil), 2005.

MERRINGTON, G.; ROGERS, S. L.; VAN ZWIETEN, L. **The potential impact of long-term copper fungicide usage on soil microbial biomass and microbial activity in an avocado orchard**. Soil Research, 2002. v. 40, n. 5, p. 749-759.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Registro nacional de cultivares**, Brasília, 27 mai. 2021. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em: 27 jun. 2021.

MOHAN, S.K. **Investigações sobre *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Amaral et al. em cafeeiros**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 4, 1976, Caxambu. Resumos... Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976. p. 56.

MONDAL, K. K.; BHAR, L.M.; MANI, C. **Combined efficacy of *Pseudomonas fluorescens* strain MBPF-01 and nanocopper against bacterial leaf blight in rice**. Indian Phytopathol 2010. v. 63, p. 266-268.

MONDAL, K. K.; MANI, C. **Investigation of the antibacterial properties of nanocopper against *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, the incitant of pomegranate bacterial blight**. Annals of microbiology, 2014. v. 62, n. 2, p. 889-893.

MOURA, K. E.; PATRICIO, F. R. A.; SILVA, M. R. L.; SILVA, M. R. L.; CASTRO, J. R. P. **Fungicidas cúpricos para o controle da ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, Brasília, DF: Embrapa Café, (CD-ROM), 2018. p. 1.

NAGAI, H.; MIYAKE, N.; KATO, S.; MAEKAWA, D.; INOUE, Y.; TAKIKAWA, Y. **Improved control of black rot of broccoli caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a bacteriophage and a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain**. Journal of General Plant Pathology, Shizuoka, 2017. v. 83, n. 6, p. 373-381.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. **O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos**. Agrarian Academy, Goiânia, 2014. v. 1, n. 1, p. 234-250.

NINOT, A.; ALETÀ, N.; MORAGREGA, C.; MONTESINOS, E. **Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut**. Plant disease, 2002. v. 86, n. 6, p. 583-587.

OLIVEIRA, JÚLIA MARQUES. **Progresso espaço-temporal da mancha aureolada em mudas de cafeeiro no viveiro**. 2017. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, F.; MEDINA, G.; FIGUEIREDO, R. **Características dos agricultores que acessam o Programa Nacional de Alimentação Escolar**. Revista de Política Agrícola, 2019. v. 27, n. 3, p. 60-68.

OLIVEIRA, J. R., ROMEIRO, R. S. **Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF - Brasil, 1990. v. 15, n.4, p. 355-357.

ORDAX, M.; MARCO-NOALES, E.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. **Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state**. Applied and environmental microbiology. 2006. v. 72, p. 3482-3488.

PATRÍCIO, F. R. A., ALMEIDA, I. M. G., MACIEL, K. W., LOPES, M. V., & BORBA, R. S. **Avaliação da eficiência de fungicidas cúpricos no controle da mancha aureolada (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) em mudas de cafeeiro**. Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento Oxiquímica Agrociência Ltda, 2012.

PAULA, P. V. A. A. **Mistura de fungicidas sistêmicos com cúpricos e análise espaço temporal de doenças do cafeeiro**. 2018. 122 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

PÉREZ, C. D. P.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; FREITAS, A. S.; SILVA, M. G. D. **Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva**. Coffee Science, Lavras, 2017. v. 12, n. 1. p. 60 - 68.

PESSANHA, S.; CARVALHO, M. L.; BECKER, M.; BOHLEN, A. V. **Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-ray Fluorescence: Comparison on two vineyards**, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2010. v. 65.

POZZA, E. A.; CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de Injúrias Causadas por Doenças em Cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. **Semiologia do Cafeeiro**: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: Editora UFLA, 2010. cap. 2, p. 91-92.

PROVENZANO, M. R.; EL BILALI, H.; SIMEONE, V.; BASER, N.; MONDELLI, D.; CESARI, G. **Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard**. Food Chemistry, 2010. v. 122, n. 4, p. 1338-1343.

QIAO, K., LIU, Q., HUANG, Y., XIA, Y., ZHANG, S. **Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol**. Crop Protection, 2020, v. 132, p. 105-114.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

RAIMUNDI, M. K.; SOUZA, R.M.; FIGUEIRA, A.R.; SILVA, G.M., G; SANTOS, A.C.P.; GUIMARÃES, S.S.C. Diagnosis of leaf bacterial diseases of coffee reveals the prevalence of halo blight. *Ciência e Agrotecnologia*, 45:e000121, 2021

RAMOS, A.H.; SHAVDIA, L.D. **A dieback of coffee in Kenya**. Plant Disease Reporter, 1976. v. 60, n. 10, p. 831-835.

REIS, H. H.; REZENDE, T. T.; MARQUES, P. H. L. **Manejo da cercosporiose com o fornecimento de hidróxido de cobre em mudas de cafeeiro**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 44., 2018, Franca. Anais... Brasília, DF: Embrapa Café, 2018. 1 p. 2018.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, p. 25-32, 1999

ROBERT, P. D. et al. **Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar-S-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato**. Crop Protection, v. 27, n. 12, p. 1519-1526, 2008.

RODRIGUES, L. M. R.; SERA, G. H.; FILHO, O. G.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA I. M. G. **First report of mixed infection by *Pseudomonas syringae* pathovars garcae and tabaci on coffee plantations**. Bragantia, 2017, v. 76, n. 4, p. 543-549.

RODRIGUES, L. M. R.; ALMEIDA, I. M. G.; PATRÍCIO, F. R. A.; BERIAM, L. O. S.; MACIEL, K. W.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO, F. O. **Mancha Aureolada do Cafeeiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. Boletim Técnico IAC, v. 212, p. 24, 2013.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. 249f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. Ed. Viçosa, Editora Universidade Federal de Viçosa, 2001a.

ROMEIRO, R.S. Métodos de diluição em placas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. In: ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, p.33-36, 2001b.

ROSSI, L.; FEDENIA, L. N.; SHARIFAN, H.; MA, X.; LOMBARDINI, L. **Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants**. Plant physiology and biochemistry, v. 135, p. 160-166, 2019.

SAKIYAMA, N.; MARTINEZ, H.; TOMAZ, M.; BORÉM, A. **Café Arábica: do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015.

SENKONDO, Y. H.; TACK, F. M. G.; SEMU, E. **Copper accumulations in soils, coffee, banana, and bean plants following copper-based fungicides in coffee farms in Arusha and Kilimanjaro regions, Tanzania**. Communications in soil science and plant analysis, v. 45, n. 15, p. 2032-2045, 2014.

SHAH, V.; BELOZEROVA, I. **Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds**. Water, air, and soil pollution, 2009. v. 197, n. 1, p. 143-148,

SHANER, G.; FINNEY, R. E. **The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mil dewing resistance in Knox wheat**. Phytopathology, São Paulo, 1977. v. 67, n. 8, p. 1051-1056.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS (AGROFIT). **Pragas/Doenças**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 15 mai. 2021.

SOUZA, J. O. G.; POZZA, E. A.; BELAN, L. L.; FREITAS, M. D. O.; OLIVEIRA, J. M. **Initial stages of infectious process of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee leaves**. Coffee Science, 2019. v. 14, n. 3, p. 338-348.

STRAYER-SCHERER, A.; LIAO, Y. Y.; YOUNG, M.; RITCHIE, L.; VALLAD, G. E.; SANTRA, S.; FREEMAN, J. H.; CLARK, D.; JONES, J. B.; PARET, M. L. **Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot**. Phytopathology, 2018. v. 108, n. 2, p. 196-205.

TAIZ, L. ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal. Metabolismos secundários e defesa vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2009. 4ª ed., Cap.13, p.342-372.

TAMM, L.; PERTOT, I.; GUBLER, W. D. **Organic grape disease management.** Plant Dis. their Manag. Org. Agric. APS Press, St Paul, 2015. p. 335-350.

TEVIOTDALE B. L.; KRUEGER W. H. (2004) **Effects of timing of copper sprays, defoliation, rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease.** Plant Dis, 2004. vol. 88, p. 131–135.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n° 473/2002**, de 15 março de 2002. Disponível em: <<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ae21e7c8-370d-42ae-86f9-0e26b701b176/language-en>>. Acesso em 10 de mar. 2021.

Varympopi, A.; Dimopoulou, A.; Theologidis, I.; Karamanidou, T.; Kaldeli Kerou, A.; Vlachou, A.; Karfaridis, D.; Papafotis, D.; Hatzinikolaou, D. G.; Tsouknidas, A.; Skandalis, N. **Bactericides Based on Copper Nanoparticles Restrain Growth of Important Plant Pathogens.** Pathogens, v. 9, n. 12, p. 1024, 2020.

VANNESTE, J. L. **Recent progress on detecting understanding and controlling Pseudomonas syringae pv actinidiae a short review.** New Zealand Plant Protection, v. 66, p. 170-177, 2013.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; SANTANA, E. D.; MARTINS, M. V. V. **Diagnóstico e manejo das doenças do cafeeiro Conilon: Livro Café Conilon.** Espírito Santo, p. 450-497, 2007.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. D. F. F.; RUDNICK, V. A. D. S.; MATOS, S. I.; FREIRE, T. C.; FONSECA, A. S.; SILVA, D. S. G. D. **Ocorrência da mancha-aureolada do cafeeiro em Rondônia.** Porto Velho: Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico, n. 401, p. 4, 2015.

XUEHUI, B.; LIHONG, Z.; YONGLIANG, H.; GUANGHAI, J.; JINHONG, L.; ZHANG, H. **Isolation and identification of the pathogen of coffee bacterial blight disease.** Chinese Journal of Tropical Crops v.34, p.738-742, 2013.

Yamada, J. K. **Resistência de isolados de Pseudomonas syringae pv. garcae ao cobre.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

YANG, Y.; HE, Z.; LIN, Y.; PHILIPS, E. J.; STOFFELLA, P. J.; POWELL, C. A. **Temporal and spatial variations of copper, cadmium, lead, and zinc in Ten Mile Creek in South Florida, USA.** Water Environment Research, v. 81, n. 1, p. 40-50, 2009.

ZAMBOLIM, L. Manejo de Doenças. In: SAKIYAMA, N S.; MARTINEZ, H. E. P.; TOMAZ, M. A.; BOREM, A. **Café Arábica do Plantio à Colheita.** Viçosa: UFV, 2015. cap. 6, p. 129-150.

ZHAO, L.; HU, Q.; HUANG, Y.; KELLER, A. A. **Response at genetic, metabolic, and physiological levels of maize (*Zea mays*) exposed to a Cu (OH)₂ nanopesticide.** ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017. v. 5, n. 9, p. 8294-8301.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. **Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba.** Bragantia, 2011. v. 70, n. 4, p. 843-849