



**CAMILA APARECIDA CARVALHO**

**USO DE NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DA  
CERCOSPORIOSE EM MUDAS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica*  
L.)**

**LAVRAS – MG  
2019**

**CAMILA APARECIDA CARVALHO**

**USO DE NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DA CERCOSPORIOSE EM MUDAS DE  
CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)**

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

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza  
Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2019**

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

Carvalho, Camila Aparecida.

Uso de nanopartículas no controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro  
(*Coffea arabica* L.) / Camila Aparecida Carvalho. - 2019.

40 p.

Orientador(a): Paulo Estevão de Sousa.

Coorientador(a): Edson Ampélio Pozza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Cercospora coffeicola*. 2. nanotecnologia. 3. doença. I. de Sousa, Paulo Estevão. II. Pozza, Edson Ampélio. III. Título.

**CAMILA APARECIDA CARVALHO**

**USO DE NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DA CERCOSPORIOSE EM MUDAS DE  
CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)**

**USE OF NANOPARTICLES TO CONTROL BROWN EYE SPOT IN COFFEE  
SEEDLING (*Coffea arabica* L.)**

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

APROVADA em 13 de Agosto de 2019.

Dr. Adélia Aziz Alexandre Pozza

Dr. Hudson Teixeira

Dr. Paulo Estevão de Souza

Prof. Dr. Paulo Estevão de Sousa  
Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me abençoar e me dar forças para seguir essa caminhada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos e oportunidades proporcionadas durante a graduação e pós graduação. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza, pela orientação e confiança. Ao co orientador Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza pela orientação e contribuição imprescindível ao trabalho Ao professor Prof. Dr. Mário Lúcio, por me orientar durante tantos anos e disponibilizar o Laboratório de Fisiologia do Parasitismo para realização de parte das análises.

Aos professores, funcionários e amigos do departamento pelos ensinamentos. À minha amiga, Dra. Deila Magna dos Santos Botelho, por toda ajuda, disponibilidade, apoio, e orientação, imprescindíveis nessa jornada. Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, e do Laboratório de epidemiologia, por ensinamentos compartilhados, por anos de companheirismo, amizade, e momentos inesquecíveis.

Ao meu irmão Leandro e meu namorado André por estarem sempre presentes e disponíveis nos momentos de necessidade Aos meus pais Francisco e Jussara por todo incentivo, confiança e por estarem sempre presentes nas horas mais difíceis, aos quais dedico essa conquista. Obrigado!

## RESUMO

A cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) é uma das principais doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e representa grave problema fitossanitário para a cultura. Dentre as estratégias de manejo da doença, a utilização da nutrição mineral equilibrada é recomendada. Nesse contexto, o fornecimento de micronutrientes e elementos na forma nanoparticulada tem se tornado alvo de estudo, devido às suas propriedades únicas. Contudo, informações acerca do emprego dessa tecnologia no manejo da cercosporiose são escassas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de nanopartículas de prata, cobre, cério, manganês, zinco e boro (Ag, Cu, Ce, Mn, Zn e B) na inibição da cercosporiose *in vitro* e *in vivo*. Na primeira etapa, “*in vitro*” foi avaliado o efeito das nanopartículas na germinação de esporos e no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *C. coffeicola*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e a análise de variância em esquema fatorial 7x5 sendo sete tratamentos (nanopartículas de Cu, Ce, Mn, Zn, Ag e B e o fungicida azoxistrobina + ciproconazol) testados em cinco doses (3, 50, 100, 250, 500 mg L<sup>-1</sup>) e um tratamento adicional (testemunha). Observou-se que as nanopartículas de prata e cobre na dose 250 mg L<sup>-1</sup>, reduziram significativamente ( $p<0,05$ ) a germinação de esporos de *C. coffeicola*, em 99% e 100% (ensaio 1), 100% e 93% (ensaio 2) comparado à testemunha. A adição das nanopartículas de boro, cobre, zinco e manganês ao meio de cultura, na dose 500 mg L<sup>-1</sup>, resultou na redução do IVCM de 100%, 94%, 79% e 93% respectivamente, comparado ao tratamento controle (testemunha). Para o ensaio *in vivo*, foi selecionada a dose de nanopartículas mais eficaz *in vitro*, 500 mg L<sup>-1</sup>, as quais foram aplicadas em mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4 posteriormente inoculadas com *C. coffeicola*. Foram quantificados a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice SPAD (Soil Plant Analysis Development), peso seco da parte aérea, teor de fenóis solúveis e lignina. O experimento “*in vivo*” foi instalado em delineamento em blocos casualizados com oito tratamentos (nanopartículas- Cu, Ce, Mn, Zn, Ag e B, fungicida azoxistrobina + ciproconazol e o tratamento controle-testemunha) com quatro repetições. O índice SPAD e o peso seco da parte aérea não diferiram significativamente entre os tratamentos testados. A aplicação preventiva das nanopartículas de prata, cério, boro e cobre proporcionou significativa ( $p<0,05$ ) redução da AACPD em 58%, 31%, 25%, 16% respectivamente. Maior teor de lignina foi observado nos tratamentos com nanopartículas de cobre, prata, zinco e fungicida.

**Palavras-chave:** *Cercospora coffeicola*. Nanotecnologia. Doença.

## ABSTRACT

Brown eye spot (*Cercospora coffeicola*) is one of the main diseases of coffee (*Coffea arabica*) and represents a serious phytosanitary problem for the crop. Among the management strategies of the disease, the nutritional balance of plants is recommended. In this context, the supply of micronutrients and elements in the nanoparticle form has become the target of study due to its unique properties. In contrast, information about the use of this technology in the management of brown eye spot in coffee plants is scarce. The objective of this study was to evaluate the effect of nanoparticles of silver, copper, cerium, manganese, zinc and boron (Ag, Cu, Ce, Mn, Zn and B) on this disease management. The nanoparticles were evaluated on spore germination and mycelial growth rate (MGR) of *C. coffeicola in vitro*. The experiment was carried out in a completely randomized design with four replicates and the variance analysis in a 7x5 factorial scheme, with seven treatments (Cu, Ce, Mn, Zn, Ag and B nanoparticles and the fungicide azoxystrobin + cyproconazole) tested in five doses (3, 50, 100, 250, 500 mg L<sup>-1</sup>) and an additional treatment (control). It was observed that the nanoparticles of silver and copper at the 250 mg L<sup>-1</sup> significantly reduced spores germination of *C. coffeicola* in 99% and 100% (trial 1), 100% and 93% (trial 2) when compared to the control. The boron, copper, zinc and manganese nanoparticles, at the 500 mg L<sup>-1</sup> provided reduction of the MGR of 100%, 94%, 79% and 93% respectively, when compared to the control. For the *in vivo* experiment, the effective dose of nanoparticles *in vitro*, 500 mg L<sup>-1</sup>, which were applied to coffee seedlings Mundo Novo 376/4 cultivar inoculated with *C. coffeicola*. The area under the disease progress curve (AUDPC), SPAD index (Soil Plant Analysis Development), dry weight, soluble phenol and lignin content were quantified. The trial was conducted in a randomized block design with eight treatments (nanoparticles- Cu, Ce, Mn, Zn, Ag and B, fungicide azoxystrobin + cyproconazole and control treatment) and four replicates. SPAD index and dry weight did not differ significantly between treatments. The preventive application of silver, cerium, boron and copper nanoparticles provided a significant (p <0.05) reduction in AUDPC in 58%, 31%, 25%, 16% respectively. Higher lignin content was quantified with application of copper, silver, zinc nanoparticles and fungicide.

**Keywords:** *Cercospora coffeicola*. Nanotechnology. Disease

## SUMÁRIO

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1   | INTRODUÇÃO .....   | 9  |
| 2   | REFERENCIAL TEÓRICO.....   | 11 |
| 2.1 | O café.....  | 11 |
| 2.2 | A cercosporiose.....   | 11 |
| 2.3 | Nutrição mineral no manejo da cercosporiose.....                                   | 12 |
| 2.4 | Nanotecnologia.....  | 13 |
| 3   | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 17 |
| 3.1 | Local de condução dos experimentos e obtenção de nanopartícula.....                | 17 |
| 3.2 | Germinação de esporos de <i>Cercospora coffeicola</i> .....                        | 18 |
| 3.3 | Índice de velocidade de crescimento micelial de <i>Cercospora coffeicola</i> ..... | 18 |
| 3.4 | Nanopartículas no manejo da cercosporiose em mudas de café.....                    | 19 |
| 3.5 | Avaliação da severidade da cercosporiose em mudas de café.....                     | 20 |
| 3.6 | Índice SPAD, peso da parte aérea seca, teor de fenóis solúveis e lignina.....      | 20 |
| 3.7 | Delineamento experimental e análises estatísticas dos ensaios .....                | 19 |
| 4   | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 22 |
| 5   | CONCLUSÕES.....  | 31 |
| 7   | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 33 |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor mundial de café, tem a safra 2019 estimada em aproximadamente 51 milhões de sacas (60 kg) do produto beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). A produção brasileira de café é ameaçada por vários fatores abióticos e bióticos, e, qualquer fator capaz de reduzir a produção, conseqüentemente afeta sua cadeia produtiva. Entre os fatores bióticos causadores de perdas, pode-se citar a cercosporiose do cafeeiro, também conhecida como mancha-do-olho-pardo, doença cujo agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. A cercosporiose causa perdas significativas na produção devido à queda prematura das folhas, em mudas nos viveiros e em plantas adultas no campo, além de afetar negativamente a qualidade de bebida (LIMA, et al., 2012, POZZA et al. 2010). Quando práticas adequadas de manejo são negligenciadas, e, as condições ambientais são favoráveis, as perdas podem chegar a 30% da produção (SOUZA et al., 2015).

De acordo com Pozza et al. (2001) a cercosporiose é a doença do cafeeiro com maior possibilidade de ser controlada com práticas culturais. Dentre elas, controle preventivo com o uso de nutrientes minerais é promissor, pois a nutrição equilibrada age nos mecanismos de defesa dos vegetais, reduz a severidade de doenças, a necessidade de aplicações de defensivos agrícolas e o impacto ambiental (DATNOFF; ELMER, HUBER, 2007; GARCIA JÚNIOR et al, 2003).

Avanços industriais recentes resultaram na fabricação de nanomateriais de diversos tamanhos, formas e aplicações. Assim, a nanotecnologia surge como estratégia no manejo de doenças de plantas (ABD-ELSALAM; PRASAD, 2018; YADAV e YADAV, 2018). Diversos trabalhos constataram a eficácia de nanopartículas de cobre, prata, zinco, no controle de fungos fitopatogênicos como *Alternaria alternata* (KIM et al. 2012), *Aspergillus flavus* (RAJIV; RAJESHWARI; VENCKATESH, 2013), *A. niger* (RAJIV; RAJESHWARI; VENCKATESH et al. 2013), *Bipolaris sorokiniana* (JO et al. 2009), *Botrytis cinerea* (HE et al. 2011; DERBALAH; ELKOT; HAMZA, 2012, PARK et al. 2006), *Colletotrichum* sp. (LAMSAL et al. 2011 a), *Fusarium oxysporum* (KIM et al. 2012), *Magnaporthe grisea* (JO et al. 2009; PARK et al. 2006), *Penicillium expansum* (HE et al. 2011), e *Pythium spinosum* (KIM et al. 2012) além de bactérias *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium tropici*, *Xanthomonas campestris* (PARK et al. 2006), *X. perforans* (OCSOY et al. 2013). O modo de ação das nanopartículas pode ser diretamente sobre o patógeno ou alterando nutrição da planta, ativando mecanismos de respostas de defesa (ELMER; MA; WHITE, 2018, LANDA et al., 2017, KAVEH et al., 2013).

A agronanotecnologia pode tornar a agricultura mais sustentável e, a aplicação dessa tecnologia no manejo de doenças de plantas, desenvolvimento e encapsulamento de nanodefensivos, poderá revolucionar a agricultura (Sangeetha et al., 2017). Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a eficácia das nanopartículas de prata, cobre, cério, boro, manganês e zinco na inibição da germinação e crescimento micelial de *C. coffeicola*, no controle da cercosporiose em mudas de cafeeiro e no teor de compostos fenólicos solúveis e lignina solúvel.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O Cafeeiro

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, em 2019, a produção nacional dessa 'commodity' pode chegar a aproximadamente 51 milhões de sacas de 60 quilos do produto beneficiado. O território brasileiro possui área referente a 1,88 milhão de hectares plantados com essa cultura. A produção tem aumentado nos últimos anos e é essencial para cerca de 50 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Tais crescimentos se devem à alta bienalidade, principalmente em lavouras da espécie *Coffea arabica* L., às condições ambientais favoráveis e à melhoria do pacote tecnológico (CONAB, 2018).

De acordo com a OIC - Organização Internacional do Café (2019) o consumo mundial de café em 2018/2019 atinge de 163 milhões de sacas, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 36% do café consumido no mundo. Existem, em média, 287 mil cafeicultores, divididos em sua maioria entre mini e pequenos, distribuídos em, aproximadamente, 1.900 municípios. O estado de Minas Gerais se destaca, com produção nacional estimada em 30,6 milhões de sacas de café beneficiado (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

É crescente a demanda por altas produtividades, porém, fatores bióticos e abióticos reduzem a produção e depreciam a qualidade do produto, dentre os fatores bióticos, destacam-se as doenças (GUIMARÃES et. al., 2010).

### 2.2 A cercosporiose

A cercosporiose, também conhecida como mancha-de-olho-pardo, doença cujo agente etiológico é o fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, é endêmica em todas as regiões produtoras de café do Brasil. Os sintomas nas folhas manifestam-se como manchas circulares, com 0,5-1,5 cm de diâmetro, com o centro acinzentado, envolvidas por halo amarelo. Nos frutos, os sintomas são manchas castanhas deprimidas. A doença reduz a produção, o peso e a qualidade dos grãos, resultando em prejuízos ao cafeicultor (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010).

Este fungo é problema constante em praticamente todas as etapas da cadeia produtiva do café. A doença atinge a cultura desde mudas em viveiros até plantas adultas, e, epidemias

severas podem ocorrer em lavouras nas quais práticas adequadas de manejo são negligenciadas (SOUZA et al., 2012).

A cercosporiose é a doença do cafeeiro com maior possibilidade de ser controlada com práticas culturais (POZZA et al., 2001). Dentre elas, controle preventivo com o uso de nutrientes minerais é promissor, pois a nutrição equilibrada age nos mecanismos de defesa dos vegetais, reduz a severidade de doenças, aplicações de defensivos agrícolas e impacto ambiental (TOMAZELA et al, 2006; GARCIA JÚNIOR et al, 2003).

### **2.3 Nutrição mineral no manejo da cercosporiose**

Dentre as estratégias de controle alternativo recomendadas para o manejo da doença em viveiro, estão a utilização de substratos adequados, controle da luminosidade, irrigação e principalmente o manejo correto da fertilidade. Tais medidas podem diminuir a utilização de fungicidas, pois a nutrição mineral exerce influência no patógeno (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010)

Plantas adubadas adequadamente se tornam mais resistentes ao ataque de patógenos (MARSCHNER, 2012), devido à influência dos nutrientes minerais na anatomia e composição química das células das plantas. No primeiro caso, células epidérmicas espessas e o maior grau de lignificação representam vantagens por dificultarem a infecção. No segundo, a síntese de substâncias repelentes ou inibitórias (fitoalexinas) pode alterar as respostas das plantas aos ataques de patógenos. Dessa maneira, a nutrição mineral, ao auxiliar a formação de barreiras de resistência horizontal, físicas e/ou químicas, pode ser considerada alternativa viável para manejo de doenças de plantas (DORNELAS et al., 2015; POZZA; POZZA, 2012; PINHEIRO et al., 2011).

As plantas adquirem os nutrientes essenciais para o seu metabolismo por meio da absorção radicular dos elementos presentes na solução do solo ou via foliar. Os nutrientes exigidos são divididos em dois grupos, os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e os micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) (EPSTEIN, 1999). Os micronutrientes, mesmo requeridos em menores quantidades, exercem funções essenciais na planta. O boro auxilia na formação da parede celular e na divisão e alongamento celular. O cobre atua na fotossíntese, respiração e está relacionado com resistência às doenças. O manganês é necessário para a produção de clorofila e afeta a disponibilidade de ferro para a planta, o qual é essencial para a síntese de clorofila. O molibdênio está associado ao metabolismo do nitrogênio. O zinco tem efeito na transformação dos carboidratos, produção de triptofano e de hormônios, é também indispensável ao alongamento celular (CARVALHO et al., 2010). Além disso, alguns

micronutrientes podem estar relacionados ao mecanismo de defesa de plantas contra patógenos (DORDAS, 2008).

A relação entre nutrição mineral e o progresso da cercosporiose já foi descrita por alguns autores. Pozza et al. (2000), estudando a adubação de potássio (K) e nitrogênio (N) em solução nutritiva, observaram relação direta da doença com a nutrição potássica. O aumento da nutrição potássica ocasionou aumento da intensidade da doença. Segundo os autores, o excesso de K induz a deficiência de cálcio e, com isso, favorece a entrada do patógeno na parede celular. Botelho et al. (2011) constataram a redução na severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro proporcionada por adubação com silício. O silício possui efeito na supressão de doenças em plantas, pois induz sinais para reações de defesa além de proporcionar acúmulo de lignina na folha (RODRIGUES et al., 2004; AMARAL et al., 2008; RESENDE et al., 2009).

Do mesmo modo, Garcia et al. (2003), ao estudar o suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva no controle de cercosporiose, constataram influência da interação K x Ca na área abaixo da curva de progresso do total de lesões, do número total de folhas e na porcentagem de área foliar lesionada.

## **2.4 Nanotecnologia**

Nanopartícula é definida como qualquer partícula produzida com dimensão de 1 a 100 nm e possui propriedades únicas não compartilhadas por partículas macroscópicas com a mesma constituição química (AUFFAN et al., 2009). O principal diferencial da escala nanométrica é a potencialização das propriedades físicas e químicas, resultante da área superficial elevada, maior grau de dispersão e funcionalidades. Tais características estão relacionadas ao tamanho da estrutura e possibilitam o uso em concentrações reduzidas (ABDI, 2010).

O investimento nesta tecnologia é crescente. De acordo com relatórios econômicos globais, deve alcançar US \$ 90,5 bilhões até 2021, com taxa de crescimento anual composta de 18,2%, de 2016 a 2021 (ANDREW MCWILLIAMS, 2016).

A nanotecnologia contribui significativamente para a competitividade e o crescimento sustentável em diversos campos de aplicação (GOUVEA, 2013). Os nanomateriais podem ocorrer de forma natural em cinzas vulcânicas, argilas, nuvens e espumas oceânicas, por exemplo, ou ser produzidos por meio de processos químicos ou físicos (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007). As nanopartículas são fabricadas a partir de diferentes materiais. Entre eles, os óxidos metálicos, as cerâmicas, os materiais magnéticos, os semicondutores, os pontos

quânticos, lipídios, polímeros sintéticos e naturais, dendrímeros e emulsões (PUOCI et al., 2008).

Cada nanopartícula possui características distintas capazes de direcioná-la a diversos setores: energia, transportes, medicina, têxtil, comunicações, alimentos, agricultura, entre outras (ABDI, 2010). Na área medicinal, estudou-se a aplicação desses nanomateriais na administração de fármacos e genes, marcações biomoleculares e engenharia de tecidos (SALATA, 2004).

Outras aplicações estão voltadas ao tratamento de efluentes industriais, produção de biofilmes comestíveis, confecção de materiais mais resistentes, entre outros (TANG e LO, 2013; KORDKHEILI; FARSI; REZAZADEH, 2013; LIU et al., 2015).

A nanotecnologia também pode contribuir de maneira promissora para o agronegócio e nos últimos anos, houve direcionamento dos estudos em nanotecnologia na agricultura (DUHAN et al., 2017). Dentre suas aplicações, pode-se citar o desenvolvimento de sensores para detecção de pesticidas (WANG et al., 2010; LIU et al., 2012), confecção de embalagens (ESPITIA et al., 2012) e remediação de efluentes (NASSAR, 2013). Adicionalmente, cita-se a significativa melhoria do desempenho e a economia de insumos, por meio do desenvolvimento de nanopartículas e nanoencapsulação para liberação controlada de fertilizantes e pesticidas. Assim, contribui significativamente para o aumento da competitividade e desempenho de processos desde o início da cadeia produtiva (MATTOSO, 2005; DURÁN et al., 2005).

Os agroquímicos nanométricos são nano-reformulações de produtos já existentes (GREEN; BEESTMAN, 2007). Espera-se das nanoformulações o aumento da solubilidade de ingredientes ativos, liberação lenta e direcionada e proteção contra degradação prematura dos defensivos na planta (KAH et al., 2013). Dessa maneira é possível alcançar maiores efeitos com menor dose, ou seja, o defensivo agrícola se torna mais eficiente. Muitas empresas formulam seus produtos com nanopartículas capazes de se dissolver em água com alta eficácia, aumentando sua atividade (KUMAR et al., 2010). Outras, empregam suspensões de partículas nanométricas, a base de óleo, contendo suspensões uniformes de nanopartículas pesticidas ou herbicidas (PÉREZ-DE-LUQUE; RUBIALES, 2009).

A ação das nanopartículas direta e indiretamente como agentes de controle de doenças de plantas é descrito por diversos autores. Nanopartículas de prata adicionadas ao meio de cultura na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  inibiram o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *Golovinomyces cichoracearum/ Sphaerotheca fusca* (LAMSAL et al., 2011 a). Jo; Kim; Jung (2009) avaliaram o efeito de íons e nanopartículas de prata, adicionadas ao meio de cultura BDA-batata, agar, dextrose, na inibição da formação de colônia de *Bipolaris*

*sorokiniana* e *Magnaporthe grisea*. As doses de 200 e 500 mg L<sup>-1</sup> foram eficazes na redução do crescimento micelial de *B. sorokiniana* e *M. grisea*, respectivamente. A eficácia no controle das doenças de acordo com período de aplicação das nanopartículas, também foi quantificada pelos autores. De acordo com os resultados, plantas de *Lolium perenne* pulverizadas com nanopartículas de prata três horas antes da inoculação com *B. sorokiniana* e *M. grisea* apresentaram menor severidade das doenças, quando comparada a aplicação da nanopartícula 24 horas após a inoculação.

Nanopartículas de prata adicionadas ao meio de cultura nas doses 1, 10, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> influenciaram no crescimento micelial de *Ophiostoma flexuosum*, *O. tetropii*, *O. polonium* e *O. ips*, resultando em redução de 100%, 81%, 68% e 46%, respectivamente, na maior dose de 100 mg L<sup>-1</sup> (VELMURUGAN et al., 2009). De acordo com os autores os íons de prata inativam os grupos tiol da parede celular fúngica, causando sua ruptura, interrompendo o metabolismo energético e a cadeia de transporte de elétrons. A eficiência fungicida da nanopartículas de enxofre no fungo *Fusarium solani* foi relatada por Rao e Paria (2013). A concentração de 570 mg L<sup>-1</sup> da nanopartícula em meio BDA inibiu aproximadamente 93% do crescimento micelial de *F. solani* e 720 mg L<sup>-1</sup> resultou em 100% de inibição. Com o uso de microscopia eletrônica, foram observados danos à parede celular do fungo. Os autores relataram a possibilidade de utilização de nanopartículas de enxofre no manejo de diversas culturas como tomate, batata, uva, principalmente, em cultivos orgânicos.

Nanopartículas de zinco (formulado Zinkicide SG6) pulverizadas em plantas de citros na dose de 0,56 kg ha<sup>-1</sup> reduziram em 38% e 42% a incidência foliar do cancro cítrico, em dois ensaios avaliados, respectivamente. Adicionalmente, os autores citam como vantagens da nanopartícula, além da atividade antimicrobiana, o movimento translaminar do produto e a menor toxicidade em relação a diferentes formulações de cobre (GRAHAM et al. 2016).

A germinação de conídios dos fungos *A. alternata*, *F. oxysporum*, *Rhizopus stolonifera* foi significativamente menor em tratamentos com nanopartículas de magnésio quando comparados aqueles com zinco, ambas na dose de 50 mg/L (Wani & Shag, 2012). Imada et al. (2016) estudaram o efeito de nanopartículas de magnésio para manejo de *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomate e observaram rápida produção de espécies ativas de oxigênio nas raízes da planta tratadas com a nanopartícula. Análises histoquímicas realizadas constataram a presença de β-1,3-glucanase e tiloses acumuladas no xilema e apoplasto do hipocótilo indicando indução de resistência em plantas de tomate ativada por nanopartícula de magnésio. A aplicação de nanopartícula de cério na dose de 250 mg/L em raízes ou folhas de tomate inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* reduziu a

severidade da doença em 48% e 46%, respectivamente, quando comparada ao tratamento controle (ADISA et al. 2017).

Os efeitos desencadeados por nanopartículas no sistema vegetal dependem de variáveis referentes ao material em si e da sua absorção, translocação e acumulação no interior do tecido vegetal (RICO et al., 2011). Wang et al. (2012), ao estudarem o impacto de nanopartículas de cério em tomate, detectaram elevado teor do elemento metálico nos tecidos vegetais. Segundo os autores, as nanopartículas foram absorvidas por raízes e translocadas para brotações e tecidos comestíveis. Concentrações de cério substancialmente altas foram detectadas nos frutos expostos a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de condução dos experimentos e obtenção das nanopartículas

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas e o experimento *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação, ambos pertencentes ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. As nanopartículas utilizadas foram os óxidos metálicos de cobre, de cério, de manganês, de zinco e metaloides de prata e boro (Tabela 1). Os metaloides foram obtidos da US Research Nanomaterials (Houston, TX). Os equivalentes de sais de sulfato foram obtidos da Fisher Scientific (New Jersey, USA). As soluções de nanopartículas foram preparadas com 12 mL de água destilada e sonicadas por 10 minutos FS20H (Fisher Scientific INC., Pittsburgh, PA). Para caracterizar as nanopartículas, sua condutividade elétrica e pH, foram quantificados (Tabela 2).

Tabela 1 - Nanopartículas utilizadas nos ensaios

| Nanopartícula              | Sigla | Granulometria |
|----------------------------|-------|---------------|
| Óxido metálico de cobre    | Cu    | 40 nm         |
| Óxido metálico de cério    | Ce    | 25 nm         |
| Óxido metálico de manganês | Mn    | 30 nm         |
| Óxido metálico de zinco    | Zn    | 10-30 nm      |
| Metalóide de prata         | Ag    | 20 nm         |
| Metalóide de boro          | B     | 1-2 $\mu$ m   |

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2 - Dados de pH e condutividade elétrica (CE) das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), cério (Ce), boro (B) e zinco (Zn) nas doses de 3, 50, 100, 250 e 500  $\text{mg L}^{-1}$

| Nanopartícula | Doses ( $\text{mg L}^{-1}$ ) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|               | 3                            |      | 50   |      | 100  |      | 250  |      | 500  |      |
|               | pH                           | CE   | pH   | CE   | pH   | CE   | pH   | CE   | pH   | CE   |
| Cu            | 7,3                          | 0,02 | 7,31 | 0,02 | 7,30 | 0,02 | 7,30 | 0,02 | 7,30 | 0,02 |
| Mn            | 7,31                         | 0,02 | 7,28 | 0,02 | 7,20 | 0,02 | 7,14 | 0,02 | 7,05 | 0,03 |
| Ce            | 6,63                         | 0,02 | 6,56 | 0,02 | 6,46 | 0,02 | 6,30 | 0,02 | 6,00 | 0,02 |
| B             | 7,00                         | 0,02 | 6,95 | 0,02 | 6,95 | 0,02 | 6,90 | 0,02 | 6,82 | 0,02 |
| Ag            | 7,13                         | 0,02 | 7,15 | 0,02 | 7,10 | 0,02 | 7,07 | 0,02 | 7,06 | 0,02 |
| Zn            | 7,14                         | 0,02 | 7,06 | 0,02 | 7,01 | 0,02 | 6,95 | 0,02 | 6,81 | 0,03 |

Fonte: Do autor (2019).

### 3.2 Germinação in vitro de esporos de *Cercospora coffeicola*

Para realização do Ensaio 1, foi utilizado o isolado de *C. coffeicola* CML 2986 proveniente do município de Lavras-MG. O isolado encontra-se depositado na coleção micológica de Lavras (CML). Para obter esporos de *C. coffeicola* foi utilizada metodologia proposta por SOUZA et al. (2012), com modificações. Oito discos de micélio do fungo, obtidos de colônias com 15 dias, foram macerados e depositados em Erlenmeyers contendo 20 mL do meio de cultura V8 líquido (100 mL de V8, 900 mL de água destilada) e agitados a 100 rpm por quatro dias a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Posteriormente, o macerado foi vertido em placas contendo meio ágar-água e as mesmas permaneceram abertas em estufa incubadora BOD por quatro dias a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  para a secagem. Após esse período, foram adicionados a cada placa 10 mL de água esterilizada para a remoção dos conídios com o auxílio de alça de Drigasliki. A suspensão de conídios foi filtrada em gaze para a retirada dos resíduos e suspensão obtida foi padronizada em câmara de Neubauer para concentração de  $3,0 \times 10^4$  esporos/mL.

O ensaio foi repetido com esporos obtidos de folhas de cafeeiro com sintomas típicos da doença, coletadas no campo (Ensaio 2). Para implementar a esporulação, essas folhas foram mantidas em câmara úmida durante o período de 24 horas. Posteriormente, com auxílio de pincel e água, os conídios foram retirados das lesões e a suspensão obtida foi padronizada com auxílio da câmara de Neubauer para concentração de  $3 \times 10^4$  esporos/mL.

Os ensaios de germinação foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições sendo cada placa de Petri considerada uma parcela experimental. A análise de variância em esquema fatorial  $7 \times 5$  sendo seis nanopartículas (Cu, Ce, Mn, Zn, Ag e B), o fungicida azoxistrobina + ciproconazol, testados em cinco doses (3, 50, 100, 250, 500 mg L<sup>-1</sup>) e um tratamento adicional (testemunha não tratada).

### 3.3 Índice de velocidade de crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*

O experimento de crescimento micelial foi realizado com o objetivo de verificar o efeito fungitóxico e fungistático de nanopartículas sobre o crescimento micelial de *C. coffeicola*. Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura V8 sólido (100 mL de suco de vegetais V8; 17 g de ágar; 3,2 g de CaCO<sub>3</sub> e 900 mL de água destilada). Para ajudar na dispersão, as suspensões de nanopartículas foram sonicadas, utilizando sonda (Fisher Scientific, FB505) a 50% de amplitude por 2 minutos e, posteriormente, foram incorporadas ao meio de cultura. Em cada placa, foi depositado no centro um disco de 6 mm de diâmetro contendo micélio do isolado de *C. coffeicola* CML

2986. Em seguida, as placas foram acondicionadas em estufa incubadora BOD a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas em intervalos de três dias após a instalação do ensaio. O índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo adaptação da fórmula proposta por MAGUIRE (1962):

$$IVCM = \frac{C1}{N1} + \frac{C2}{N2} + \dots + \frac{Cn}{Nn},$$

em que: C1, C2 e Cn = diâmetro da colônia na primeira, segunda e n-ésima avaliação; N 1, N 2, N n = número de dias após a instalação do ensaio.

O experimento de IVCM foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma parcela experimental. A análise de variância em esquema fatorial 6 x 5 sendo cinco nanopartículas (Cu, Mn, Zn, Ag e B), o fungicida azoxistrobina + ciproconazol, testados em cinco doses (3, 50, 100, 250, 500 mg L<sup>-1</sup>) e um tratamento adicional (testemunha).

### 3.4 Nanopartículas no manejo da cercosporiose em mudas de cafeeiro

Foram utilizadas para o ensaio *in vivo* mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, suscetível à cercosporiose. As plantas foram mantidas em casa de vegetação ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) durante todo o período experimental. Quando atingiram quatro pares de folhas definitivas, as mudas foram pulverizadas com as nanopartículas (Cu, Ce, Mn, Zn, Ag e B) na dose de 500 mg L<sup>-1</sup>, a mais eficaz obtida nos ensaios *in vitro*. O fungicida registrado para controle da doença, azoxistrobina + ciproconazol, foi aplicado na dose recomendada para (500 mL ha<sup>-1</sup>), além do tratamento controle, pulverizado apenas com água (testemunha). As suspensões de nanopartículas foram sonicadas utilizando sonda (modelo Fisher Scientific, FB505®), a 50% de amplitude por 2 minutos, para ajudar na dispersão de partículas antes da pulverização nas plantas. Sete dias após pulverizar os tratamentos, as plantas foram inoculadas com esporos de *C. coffeicola*, obtidos de acordo com metodologia proposta por SOUZA et al. (2012), com modificações. A suspensão de conídios foi ajustada em hemacitômetro para 3,0 x 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup> e aplicada com atomizador ‘De Vilbiss’, nas face abaxial e adaxial das folhas de cafeeiro. Posteriormente as mudas foram mantidas em câmara úmida (utilizando sacos plásticos transparentes), por 72 horas, para propiciar molhamento foliar para facilitar o processo de infecção.

### 3.5 Avaliação da severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro

As avaliações da severidade da cercosporiose foram realizadas semanalmente, a partir dos primeiros sintomas da doença, totalizando cinco avaliações. Foram avaliados dois pares de folhas inoculadas em cada planta. A severidade foi quantificada por meio da escala de Custódio et al. (2011).

Os dados coletados semanalmente foram utilizados para plotar a área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD), de acordo com Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=l}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

$y_i$ : proporção da doença na  $i$ -ésima observação;

$t_i$ : tempo, em dias, na  $i$ -ésima observação;

$n$ : número total de observações

### 3.6 Índice SPAD, peso da parte aérea seca, teor de compostos fenólicos solúveis totais e lignina solúvel

O Índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) foi quantificado com o auxílio do aparelho SPAD 502 da empresa japonesa Minolta (MATSUMOTO et al., 2008). De cada planta foi selecionado o quarto par de folhas completamente expandidas sendo realizadas quatro leituras. Foram realizadas três avaliações sendo a primeira sete dias antes da pulverização com os respectivos tratamentos, a segunda sete dias após a pulverização dos tratamentos e a terceira 70 dias após a pulverização dos tratamentos ( final do ensaio).

Com o término da avaliação dos ensaios em mudas, a parte aérea foi separada do caule de cada planta, e as duas seções vegetais levadas à estufa com aproximadamente 60°C. Após atingirem peso constante, foram determinados os respectivos pesos secos em miligrama.

Para determinar a concentração de compostos fenólicos solúveis totais utilizou-se o método descrito por Spanos e Wrolstad et al., (1990), com algumas modificações. Em microtubos de 1,5 mL, alíquotas de 150 µL do extrato metanólico foram misturadas com 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N por 5 minutos. Após este período, adicionou-se 150 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram diluídas em 1mL de água destilada e permaneceram à temperatura ambiente por uma hora. Os valores de absorvância desta reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro.

Para quantificação do teor de lignina, os tecidos foliares coletados foram triturados e uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubos de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante da solução foi descartado e o resíduo foi levado para estufa a 65°C por 15 horas. Após este período, foi adicionado aos tubos 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10), os quais foram colocados em banho-maria a 100°C por 4 horas. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos, descarte do sobrenadante, adição de 1,5 mL de água ultrapura e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 M. Os tubos foram colocados em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foi adicionado 200 µL de HCl concentrado. Após período de precipitação (4 horas a 4°C) foi realizada nova centrifugação, descarte do sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina por miligrama de massa seca (DOSTER; BOSTOCK, 1988).

O experimento “*in vivo*”, onde foram mensurados a AACPD, teor de clorofila, peso da parte aérea seca, teor de fenois solúveis e lignina solúvel, foi instalado em delineamento em blocos casualizados com oito tratamentos (nanopartículas- Cu, Ce, Mn, Zn, Ag e B, fungicida azoxistrobina + ciproconazol e a testemunha) e quatro repetições, sendo a parcela experimental composta por três mudas de cafeeiro.

### **3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas dos ensaios**

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 de germinação e IVCN não atenderam os 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. Foi realizada análise de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) entre AACPD e peso da parte aérea seca. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team 2013).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da porcentagem de germinação de esporos observou-se diferença entre o tratamento controle (testemunha) e os demais tratamentos ( $P < 0,000$ ) (Tabelas 3 e 4). Para germinação de esporos obtidos em laboratório, a dose de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  foi a mais eficaz na redução da germinação, sendo semelhante ao tratamento contendo azoxistrobina + ciproconazol, com exceção da nanopartícula de boro e manganês (Tabela 3). As nanopartículas de prata, cério e cobre na dose de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram redução da germinação de 100%, 99,66%, 98,64% comparadas às testemunha.

Tabela 3. Efeito das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), prata (Ag), boro (B), cério (Ce), manganês (Mn) e do fungicida azoxistrobina+ciproconazol testadas em diferentes doses na germinação de esporos de *C. coffeicola* obtidos por processo de esporulação em placas (Ensaio1).

| Tratamento/<br>Doses <sup>a,b</sup> | 3       | 50      | 100     | 250     | 500     |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ag                                  | 40,5 b  | 7,25 a  | 4,50 a  | 0,50 a  | 0,00 a  |
| B                                   | 52,75 c | 44,00 d | 37,25 c | 38,75 d | 39,00 c |
| Ce                                  | 47,50 c | 18,50 b | 14,00 b | 1,25 a  | 0,25 a  |
| Cu                                  | 43,00 b | 15,25 b | 3,00 a  | 0,00 a  | 1,00 a  |
| Mn                                  | 75,75 d | 32,75 c | 44,00 d | 18,00 c | 18,75 b |
| Zn                                  | 21,25 a | 7,75 a  | 7,25 a  | 8,00 b  | 4,25 a  |
| Fungicida                           | 50,00 c | 12,50 b | 9,75 b  | 1,75 a  | 0,50 a  |
| Testemunha <sup>c</sup>             | 74,00** |         |         |         |         |

<sup>a</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $P 0,05$ ).<sup>b</sup>Dados transformados para raiz ( $x + 0,5$ ). <sup>c</sup>Contraste fatorial x tratamento adicional (testemunha) significativo a  $P < 0,000$  (\*\*).

Fonte: Do autor (2019).

O aumento gradativo das doses das nanopartículas resultou em redução da germinação dos esporos de *C. coffeicola*, exceto para nanopartícula de boro, a qual, a partir da dose de  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , permaneceu com taxa de germinação praticamente constante. Na menor dose testada ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ), a nanopartícula de zinco foi a mais eficaz, apresentando 21,25% de germinação, diferindo dos demais tratamentos. As nanopartículas de prata e zinco, na dose de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , foram mais eficazes na inibição de germinação quando comparadas ao fungicida (Tabela 3). Apesar da redução do percentual de germinação, da dose 3 para a dose  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , as nanopartículas de boro e magnésio, foram as menos eficazes para a variável avaliada.

Tabela 4. Efeito das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), prata (Ag), boro (B), cério (Ce) e do fungicida azoxistrobina+ciproconazol testadas em diferentes doses na germinação de esporos de *C. coffeicola* obtidos de folhas com sintomas da cercosporiose do cafeeiro (Ensaio 2).

| Tratamento/<br>Doses <sup>a,b</sup> | 3       | 50      | 100     | 250     | 500     |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ag                                  | 56,25 a | 13,25 a | 0,50 a  | 0,00 a  | 0,25 a  |
| Boro                                | 61,75 b | 54,25 c | 54,25 c | 48,25 d | 49,50 d |
| Ce                                  | 66,50 b | 52,50 c | 46,00 c | 51,00 d | 24,25 c |
| Cu                                  | 63,50 b | 19,50 a | 19,25 b | 5,50 b  | 2,25 a  |
| Mn                                  | 69,00 b | 70,00 d | 47,50 c | 17,25 c | 8,75 b  |
| Zn                                  | 50,37 a | 31,00 b | 22,50 b | 18,00 c | 11,50 b |
| Fungicida <sup>d</sup>              | 55,00 a | 24,50 b | 27,25 b | 21,50 c | 6,25 b  |
| Testemunha <sup>c</sup>             | 78,50** |         |         |         |         |

<sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P 0,05). <sup>b</sup> Dados transformados para raiz ( $\sqrt{x} + 0,5$ ). <sup>c</sup> Contraste fatorial x tratamento adicional (testemunha) significativo a P < 0,000 (\*\*). Fonte: Do autor (2019).

Na avaliação da germinação de esporos obtidos de folhas com sintomas da cercosporiose, na dose de 3 mg L<sup>-1</sup>, as nanopartículas de prata, zinco e o fungicida azoxistrobina + ciproconazol reduziram a germinação em 28,34%, 35,84%, 29,93%, respectivamente, em relação à testemunha. Na dose de 100 mg L<sup>-1</sup> a nanopartícula de prata reduziu a germinação em 99,36% quando comparada à testemunha (Tabela 4). No tratamento com nanopartícula de boro, mesmo com o aumento das doses (de 50 a 500 mg L<sup>-1</sup>) não se observou redução significativa na germinação dos esporos de *C. coffeicola*. A adição do fungicida azoxistrobina + ciproconazol ao meio de cultura, proporcionou redução de 92,03% na germinação de esporos *C. coffeicola* obtidos de folhas com sintomas de cercosporiose e de 99,32% em esporos obtidos por esporulação em placas, na dose de 500 mg L<sup>-1</sup> (Tabelas 3 e 4).

As nanopartículas mais eficazes nos experimentos de germinação, prata, cobre e zinco também apresentaram resultados eficazes na inibição de germinação de esporos de outros fungos fitopatogênicos como *A. alternata*, *B. sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Peronospora tabacina*, *Sclerotinia sclerotiorum* (MIRSHA et al., 2014, OUDA, 2014, WAGNER et al., 2016; MIN et al., 2009). A porcentagem de germinação de esporos de *Fusarium culmorum* incubados em solução de nanopartícula de prata na concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> foi de apenas 2,18%, comparada ao tratamento controle (KASPROWICZ et al., 2010). A dose de 65 mg L<sup>-1</sup> de nanopartícula de zinco resultou em aproximadamente 0% de germinação de esporos de *P. tabacina* (WAGNER et al., 2016). Min et al. (2009) observaram

inibição na germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* quando estes foram colocados em meio de cultura malte com nanopartícula de prata na concentração de  $7 \text{ mg L}^{-1}$ . Adicionalmente, em análises microscópicas, foi constatado plasmólise e colapso das hifas quando estas foram colocadas em contato com a nanopartícula de prata.

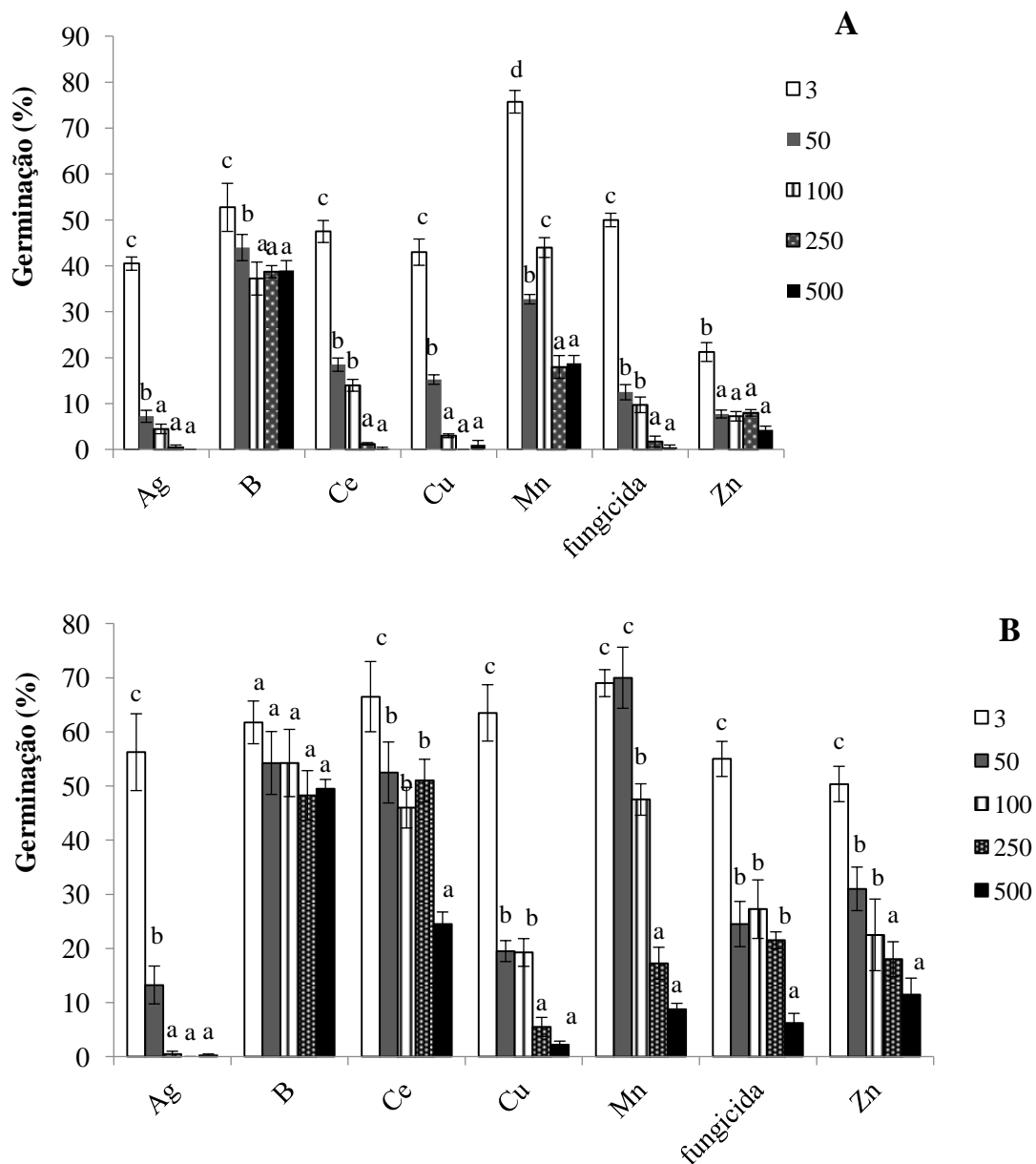
Diversos mecanismos podem estar envolvidos na atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata, cobre e zinco muitas delas relacionadas a danos a integridade da parede celular dos microrganismos, resultando em extravasamento de compostos intracelulares e morte celular (ELMER et al., 2018, DURÁN et al. 2016, HE et al., 2010, EVANS et al., 2007). Segundo Magdalane et al. (2016), a eficácia antimicrobiana de nanomateriais depende do seu tamanho, área superficial específica, morfologia, etc. Normalmente, quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial e, conseqüentemente, maior contato com os microrganismos.

Com aumento das doses observou-se redução na germinação dos esporos obtidos por esporulação em placas (Ensaio 1), com exceção das nanopartículas de boro e manganês (Figura 1A). As doses de 250 e 500  $\text{mg L}^{-1}$  foram as mais eficazes. Já no experimento de germinação com esporos obtidos de folhas com sintomas da cercosporiose (Ensaio 2), a germinação dos conídios no tratamento com nanopartícula de boro foi praticamente constante, independente do aumento das doses, resultado também observado no Ensaio 1, indicando ausência de efeito na germinação de *C. coffeicola* (Figuras 1A e 1B). De acordo com Elmer; Ma; White (2018) nanopartículas de boro são relacionadas com ativação de respostas de defesa da planta, fato que pode explicar a ineficácia deste tratamento na germinação dos esporos de *C. coffeicola in vitro*. Verificou-se também a necessidade de maior dose das nanopartículas para redução de germinação em esporos obtidos em campo, demonstrando diferença de efetividade dos esporos de *C. coffeicola* conforme a origem (Figuras 1 A e 1 B).

Os tratamentos mais eficazes nos dois ensaios de germinação, nanopartículas de prata, cobre e o fungicida azoxystrobina+ ciproconazole, na dose de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  inibiram a germinação de esporos em 100, 98 e 99,34% obtidos por processo de esporulação em placas e 99,68, 97,13 e 92,03% em esporos obtidos de folhas com sintomas da cercosporiose, respectivamente.

Não foi possível avaliar o efeito da nanopartícula de cério no IVCN de *C. coffeicola*. Ocorreu alto índice de contaminação das placas, mesmo com o procedimento de esterilização realizado para todas as nanopartículas testadas. Possivelmente durante o processo de síntese da nanopartícula de cério, ocorreu contaminação fúngica, a qual foi constatada com a adição desta ao meio de cultura.

Figura 1. Efeito das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), cério (Ce), zinco (Zn), prata (Ag), Boro (B) e do fungicida azoxistrobina+ciproconazol testados nas doses de 3, 50, 100, 250, 500 mg L<sup>-1</sup> na germinação de esporos de *C. coffeicola* obtidos por esporulação em placas- Ensaio 1 (A) e de folhas com sintomas da cercosporiose – Ensaio 2 (B).



Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: Do autor (2019).

Assim como observado nos experimentos de germinação, o IVCM apresentou diferença entre o tratamento controle (testemunha) e os demais tratamentos avaliados (Tabela 5). A redução no IVCM da dose de 0 para 500 mg L<sup>-1</sup> foi de 100%, 99,9%, 99,7% e 99,9% para as nanopartículas de boro, cobre, zinco e manganês, respectivamente. A nanopartícula de prata apresentou IVCM semelhante a testemunha (Tabela 5). Tais resultados são contrastantes com obtidos por Krishnaraj et al.(2012) que avaliaram o efeito de nanopartículas de prata nos

fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Curvularia lunata* e constataram na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> significativa atividade inibitória em todos os patógenos testados. Contudo, vale ressaltar a ocorrência de diferença de eficácia de nanopartículas de prata na inibição do crescimento micelial de acordo com a espécie de fungo avaliado.

Jo et al. (2009) estudaram a sensibilidade de duas espécies de fungos (*B. sorokiniana* e *M. grisea*) à nanopartícula de prata. A concentração efetiva da nanopartícula que proporcionou redução de 50% formação colônia (EC 50%) foi de 8,8; 4,8 e 5,4 mg L<sup>-1</sup> às 1, 3 e 6 horas após incubação das placas (HAI) para *B. sorokiniana*, respectivamente. Já para *M. grisea* as concentrações foram 3,9; 4,7 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>, às 1, 3 e 6 HAI, respectivamente, indicando maior sensibilidade de *M. grisea* à prata

A inibição de crescimento micelial foi mensurada em placas contendo nanopartículas de cobre sendo constatada halo de inibição de 25 mm para o fungo *Fusarium equiseti*, 20 mm em *F. oxysporum* e 19 mm para *F. culmorum* comparada a testemunha (BRAMHANWADEET al., 2016). A utilização de nanopartículas de cobre na redução do crescimento micelial é relatada em outros fungos fitopatogênicos (*Phoma destructive*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum*) apresentando resultado mais eficaz quando comparado ao fungicida bavistin (Kanhed et al., 2014).

A nanopartícula de boro apresentou resultados contrastantes na germinação de esporos e no IVCM. Enquanto para germinação o aumento das doses da nanopartícula não reduziu significativamente esta variável, para o IVCM, o aumento da dose de 3 para 500 mg L<sup>-1</sup>, resultou em total inibição do IVCM (Tabela 5). O IVCM foi semelhante em todas as doses testadas para a nanopartícula de prata (Figura 2).

Tabela 5. Índice de Velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *C. coffeicola* nos diferentes tratamentos testados

| Tratamento/Doses <sup>a,b</sup> | 3      | 50     | 100    | 250    | 500    |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ag                              | 1,00 a | 1,01 c | 0,90 b | 0,85 c | 0,78 b |
| Boro                            | 1,46 b | 1,27 d | 1,39 c | 0,73 c | 0,00 a |
| Cu                              | 0,9 a  | 0,64 b | 0,67 b | 0,16 a | 0,05 a |
| Mn                              | 1,02 a | 1,09 c | 0,83 b | 0,40 b | 0,07 a |
| Zn                              | 0,98 a | 0,91 c | 0,77 b | 0,55 c | 0,20 a |
| Fungicida <sup>d</sup>          | 1,11 a | 0,34 a | 0,02 a | 0,00 a | 0,00 a |
| Testemunha <sup>c</sup>         |        | 0,98** |        |        |        |

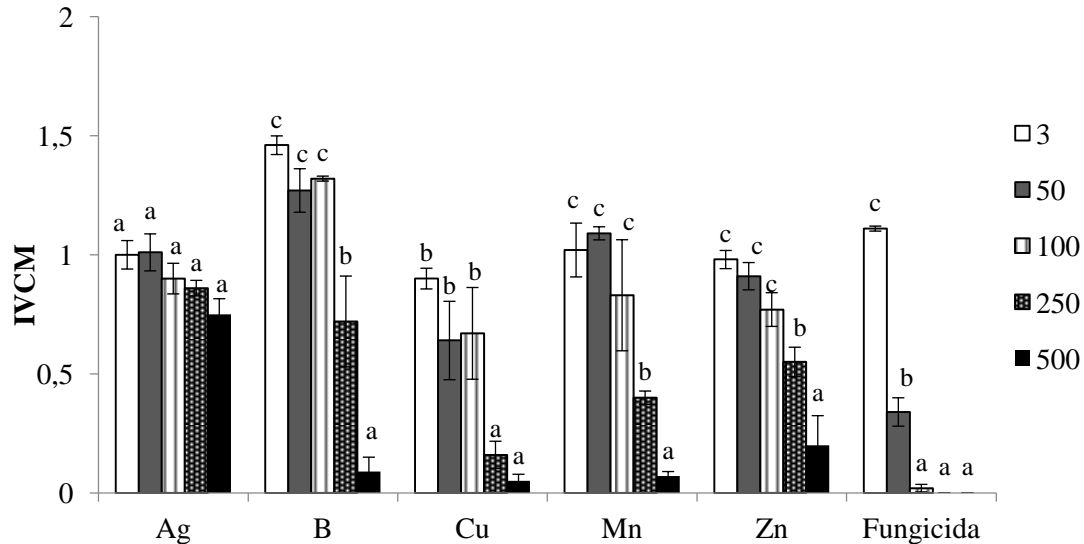
<sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P 0,05). <sup>b</sup> Dados transformados para raiz (x) + 0,5. <sup>c</sup> Contraste fatorial x tratamento adicional (testemunha) significativo a P < 0,000 ( \*\* ).

Fonte: Do autor (2019).

A dose mais eficaz, que resultou redução significativa do IVCM nas nanopartículas de boro, prata e manganês foi  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . O tratamento com fungicida azoxistrobina + ciproconazol na dose de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou IVCM praticamente nulo, não diferindo significativamente das doses  $250$  e  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 2).

O efeito de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) foi avaliado no crescimento micelial de *B. cinerea* e *P. expansum* sendo constatado que concentrações superiores a  $244 \text{ mg L}^{-1}$  inibiram significativamente o crescimento dos fungos avaliados (He et al., 2010). Adicionalmente, com uso de microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram diferentes modos de ação das ZnO NPs em *B. cinerea* e *P. expansum*. As nanopartículas inibiram o crescimento de *B. cinerea* afetando as funções celulares, e resultando na deformação das hifas fúngicas. Já em *P. expansum*, ZnO NPs impediram o desenvolvimento de conidióforos e conídios, levando à morte de hifas fúngicas.

Figura 2. Efeito das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), prata (Ag), Boro (B) e do fungicida azoxistrobina+ciproconazol nas doses de 3, 50, 100, 250, 500  $\text{mg L}^{-1}$  no índice de velocidade de crescimento micelial de *C. coffeicola*. \*\* significativo a 1% de probabilidade.



Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

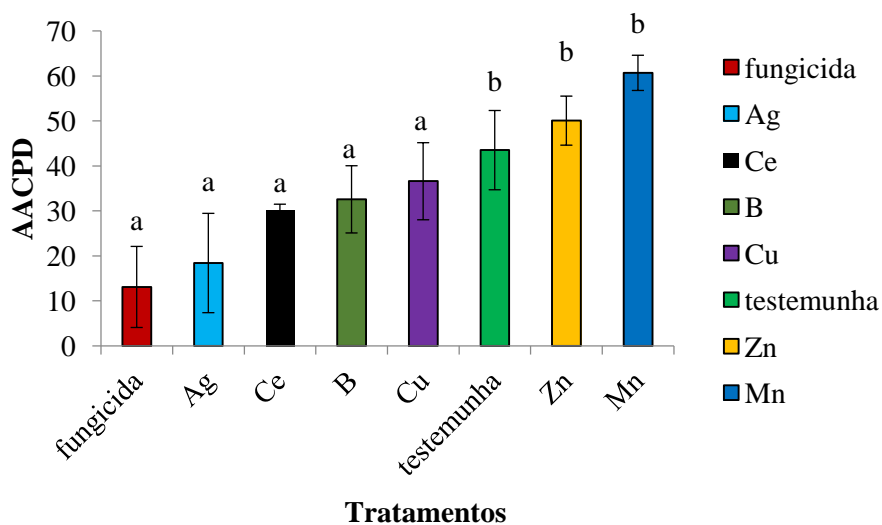
Fonte: Do autor (2019).

A AACPD diferiu significativamente entre os tratamentos testados. O percentual de controle comparado a testemunha foi de 58%, 31%, 25% e 16% para as nanopartículas de

prata, cério, boro e cobre, respectivamente (Figura 3). Os resultados obtidos na redução da severidade da doença, corroboram com os obtidos *in vitro*, pois, as nanopartículas de cobre e prata foram eficazes na redução da germinação de esporos e as de boro e cobre na redução do IVCM de *C. coffeicola*.

A aplicação das nanopartículas antes da inoculação com *C. coffeicola* pode ter contribuído para a redução da severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro. Lamsal et al. (2011 a) observaram maior incidência do oídio em plantas de pepino pulverizadas com nanopartículas de prata após a ocorrência da doença quando comparada a aplicação antes da ocorrência. A incidência da doença foi de 57,8%, 48,8%, 40,2% e 20% nas plantas pulverizadas com a nanopartícula após a ocorrência e de 45%, 40%, 27% e 18% nas pulverizadas antes da ocorrência do oídio nas doses de 10, 30, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Figura 3 Efeito das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), prata (Ag), boro (B), cério (Ce) e do fungicida azoxistrobina+ciproconazol na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).



Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Fonte: Do autor (2019).

Jo et al. (2009) verificaram diferença de eficácia da nanopartícula de prata aplicada 3 horas antes da inoculação (tratamento pré- inoculação) e 24 horas após a inoculação (tratamento pós- inoculação) com *B. sorokiniana* e *M. grisea*. Na avaliação da severidade da doença, observaram redução de 69,04% e de 92,71%, comparado a testemunha, quando a nanopartícula foi aplicada antes da inoculação, para *B. sorokiniana* e *M. grisea*, respectivamente. Já para aplicação da nanopartícula após a inoculação, *B. sorokiniana* não apresentou redução de severidade e *M. grisea*, apenas 4%. Desta forma, infere-se que a

aplicação de nanopartículas para o manejo de doenças é mais eficaz quando realizada antes do desenvolvimento dos sintomas e/ou sinais da doença.

Vale ressaltar ainda que, a dose utilizada no ensaio *in vivo*,  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , é 1000 vezes menor que a dose usualmente recomendada de aplicação de micronutrientes via foliar, visando nutrição do cafeeiro.

Giannousi et al. (2013) compararam as nanopartículas CuO, Cu<sub>2</sub>O, e Cu/Cu<sub>2</sub>O ao fungicida cúprico registrado para requeima da batata (*Phytophthora infestans*) e verificaram eficácia no controle da doença com pulverização da nanopartícula CuO aplicada nas doses de 150 – 340 mg/L. De acordo com KHAN e RIZVI (2014), o uso de nanopartículas no manejo de doenças de plantas é uma abordagem nova e sofisticada e pode se mostrar muito eficaz no futuro com o progresso do aspecto de aplicação da nanotecnologia.

O índice SPAD não apresentou diferença significativa entre os tratamentos testados, em nenhuma das épocas de avaliação. As leituras do medidor portátil de clorofila (SPAD) apresentam correlação significativa com os teores de clorofila extraível das plantas (ARGENTA et al., 2001; ZOTARELLI et al., 2003). Desta forma, infere-se que as nanopartículas aplicadas em mudas de cafeeiro na dose de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  não alteraram significativamente os teores de clorofila extraível.

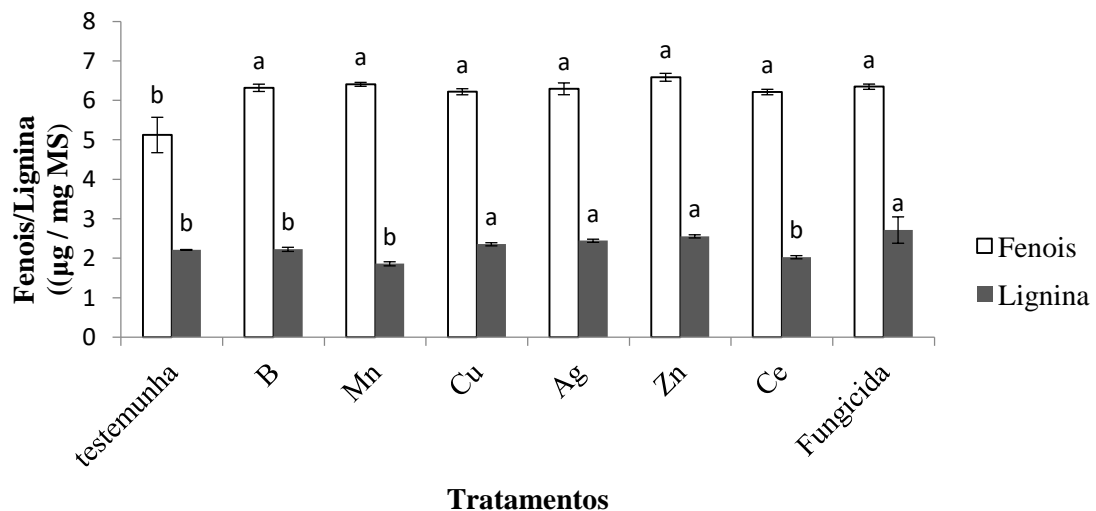
Assim como observado no índice SPAD, os tratamentos testados não influenciaram significativamente o peso seco da parte aérea das mudas de cafeeiro. De acordo com esse resultado, as nanopartículas não influenciaram negativamente o crescimento das mudas de cafeeiro. A correlação entre peso da parte aérea seca e AACPD não foi significativa.

Os teores de fenóis solúveis totais diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) somente em relação ao tratamento controle (testemunha) (Figura 4). Este resultado corrobora com Monteiro (2011), em ensaio com diversos fosfitos associados ou não ao fungicida ciproconazol + azoxistrobina para controle da ferrugem do cafeeiro. Com exceção da testemunha, todos os tratamentos inoculados com *Hemileia vastatrix*, apresentaram maior teor de fenóis solúveis. Compostos fenólicos são conhecidos como substâncias fungitóxicas e, em alta concentração nas células, podem ser oxidadas a quinonas, constituindo-se em componentes de defesa do vegetal contra fatores externos (NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT, 1992; PASCHOLATI e LEITE, 1994).

A aplicação das nanopartículas de prata, cobre, zinco e o tratamento com fungicida apresentaram os maiores teores de lignina, diferindo dos demais tratamentos testados ( $p < 0,05$ ) (Figura 4). De acordo com Elmer; Ma; White (2018) nanopartículas de prata, cobre, zinco podem estar relacionadas com ativação de respostas de defesa da planta. Esta hipótese justifica os resultados encontrados, pois dentre os mecanismos de defesa, a lignificação dos

tecidos é uma das mais importantes (BHUIYAN et al. 2009). A quantificação do teor de lignina solúvel foi realizada aos 70 dias após a aplicação dos tratamentos, superior ao tempo de coleta geralmente relatado para o patossistema *C. arabica* x *C. coffeicola*, 14 dias (PEREIRA et al., 2012), 20 dias (AMARAL et al., 2008). Assim, o acúmulo de lignina pode ser quantificado em períodos mais extensos após aplicação de tratamentos. MISHRA et al. (2014) em análise histoquímica por coloração em plantas de trigo constataram significativo efeito do tratamento com nanopartículas de prata na indução da deposição de lignina nas plantas avaliadas.

Figura 4. Efeito das nanopartículas de cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), prata (Ag), boro (B), cério (Ce), e do fungicida azoxistrobina+ciproconazol nos teores foliares de fenóis solúveis totais (equivalente a micrograma de ácido clorogênico por miligrama de matéria seca) e de lignina solúveis em ácido tioglicólico (equivalente a micrograma de lignina por miligrama de matéria seca).



Médias seguidas pela mesma letra na barra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ )  
 Fonte: Do autor (2019).

Dentre os mecanismos de defesa das plantas, a deposição de lignina fornece defesa física (suporte mecânico) e química (alta resistência à degradação enzimática) contra os patógenos e sua biossíntese pode ser constitutivamente programada ou induzida (LIU et al., 2018; MALINOVSKY et al., 2014; TAIZ e ZEIGER, 2009).

## 5 CONCLUSÕES

As nanopartículas de prata e cobre na dose de 250 mg L<sup>-1</sup> reduzem germinação de esporos de *C. coffeicola*

As nanopartículas de boro, cobre, manganês e zinco na dose de 500 mg L<sup>-1</sup> inibem o crescimento micelial de *C. coffeicola*.

Aplicação de nanopartículas de prata, cério, boro e cobre na dose de 500 mg L<sup>-1</sup> reduz a área abaixo da curva de progresso da severidade da cercosporiose do cafeeiro.

Nanopartículas de prata, cobre e zinco e o fungicida azoxistrobina + ciproconazol aumentam o teor de lignina solúvel em mudas de cafeeiro.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cercosporiose do cafeeiro, é, dentre as doenças que ocasionam perdas para a cafeicultura brasileira, a mais influenciada por condições nutricionais da planta. Neste contexto, a nanotecnologia é uma alternativa para o manejo desta doença. São necessários mais estudos a fim de elucidar os riscos e os benefícios potenciais da nanotecnologia, visto que a mesma é considerada a base para a próxima revolução industrial.

As nanopartículas de prata e cobre apresentaram resultados promissores *in vitro* e *in vivo*, seja por toxicidade direta ao patógeno e/ou possível indução dos mecanismos de resistência do cafeeiro. Como trabalhos futuros, sugere-se estudar o modo de ação das nanopartículas na interação *C. arabica* x *C. coffeicola* com uso de microanálises de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e quantificação de possível indução de resistência ativada pela aplicação das nanopartículas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2010). **Cartilha sobre Nanotecnologia**. Brasília: MDCI; Campinas: UNICAMP
- ABD-ELSALAM,K.A.;PRASAD, R. **Nanobiotechnology Applications in Plant Protection**, Springer, 394p. 2018.
- ABKHOO, J., PANJEHKEH, N. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles on *Fusarium oxysporum*. **Int J Inf Secur** 4(2):e41126, 2017.
- ADISA, I.O. et al. Evaluating the role of CeO<sub>2</sub> nanoparticle in the suppression of Fusarium wilt disease in tomato plant. Paper presented at the 6th Sustainable Nanotechnology Conference, Los Angeles, CA, 2017.
- AMARAL, D.R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.33, p.425-431, 2008.
- ANDREW MCWILLIAMS (United States). Bcc Research. **The Maturing Nanotechnology Market: Products and Applications**. Wellesley: Bcc Research, 2016. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-products-applications-report-nan031g.html>>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- ARGENTA, G.et al. Relação da leitura do clorofilometro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista brasileira de Fisiologia Vegetal** , v. 13, n. 2, p.158-167, 2001.
- AUFFAN, M.et al. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.634-641, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 20 nov. 2014.
- BRAMHANWADE, K., SHENDE, S., BONDE, S., GADE, A., RAI, M. Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases. **Environmental Chemistry Letters**, v.14, p.224-236, 2016.
- BOTELHO, D. M. S. et al. Efeito do silício na intensidade da cercosporiose e na nutrição mineral de mudas de cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 23-29, 2011.
- BHUIYAN, N.H. et al. Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling & Behavior*, v. 4, n.2, p.158-159, 2009.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, Melville, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.
- CARVALHO, G. et al. **Sintomas de desordens nutricionais injúrias em cafeeiro**. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). *Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitários e fisiológicos*. Lavras: UFLA, 2010, p. 29-66.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2019 segundo levantamento, maio/2019** - Brasília: Conab, 2019 <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cafes>> Acesso em: 08 de junho de 2019.

CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1067-1076, nov/dez, 2011.

DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. **Mineral nutrition and plant disease**. 2007 pp. 278 pp

DERBALAH, A., ELKOT, A.E., - HAMZA, A.M. Laboratory evaluation of botanical extracts, microbial culture filtrates and silver nanoparticles against *Botrytis cinerea*. **Annals of Microbiology**, 62, 1331-1337, 2012

DORDAS, C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v. 28, n.1, pp.33-46, 2008.

DORNELAS, G.A. et al. Nitrogen and potassium fertilization on the yield and intensity of the maize white spot. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 62, n.4, p. 351- 359, jul-ago, 2015.

DUHAN, J. S. et al. **Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture**. Biotechnology Reports, [s.l.], v. 15, p.11-23, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2017.03.002>.

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

DURÁN, N. C.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (Ed.). **Nanotecnologia: introdução preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações**. São Paulo: Artliber, 2005.

ELMER, W. H.; WHITE, J. C. The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. **Environmental Science: Nano**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.1072-1079, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c6en00146g>>. Acesso em 18 de jan. 2019.

ELMER, W., MA, C., WHITE, J. Nanoparticles for plant disease management. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v.6, p.66–70, 2018

ELMER, W., WHITE, J. **The Future of Nanotechnology in Plant Pathology**. Annual Review Phytopathology, v. 56, p. 111–133, 2018.

EMBRAPA. **Nanotecnologia**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-nanotecnologia/nota-tecnica>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology and Evolution**, Davis, v. 50, p. 641-664, June 1999.

ESPITIA, P.J.P. et al. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food Bioprocess Technol**, 5:1447–1464, 2012.

- FERNANDEZ-BORRERO, O., MESTRE, A.M. & DUQUE, S.I.L. Efecto de la fertilización en la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) en frutos de café. **Centro Nacional de Investigaciones de Café** 17:5-17. 1966.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.3, p.286-291, 2003.
- GIANNOUSI K, AVRAMIDIS I, DENDRINOUSAMARA C: Synthesis, characterization and evaluation of copper based nano-particles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. **RSC Advances**, v. 3 p.21743–21752, 2013.
- GOUVEA, R. Nanotecnologia, Um Novo Paradigma de Desenvolvimento Economico: Uma Análise da Experiência Internacional & Brasileira. **Revista Estratégica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 46-67, 2013.
- GRAHAM, J. H. et al. Potential of Nano-Formulated Zinc Oxide for Control of Citrus Canker on Grapefruit Trees. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p.2442-2447, 2016.
- GREEN, J.M.; BEESTMAN, G.B. Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 320–327, 2007.
- GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas Lavras, MG: Ed. UFLA, 2010. 215p.
- HE L, LIU Y, MUSTAPHA A, LIN M (2011) Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiol Res**, v. 166, n. 3, p.207–215, 2011.
- IMADA, K. et al. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. **Plant Pathology**, v.65, n.4, p.551–60, 2016.
- JO Y-K, KIM BH, JUNG G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Disease**, v. 93, n10, p. 1037–1043, 2009.
- KAH, M.; BEULKE, S.; TIEDE K.; HOFMANN, T. Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.43, n.16, p. 1823–1867, 2013.
- KASPROWICZ, M.J., KOZIOŁ, M., GORCZYCA, A. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Can. J. Microbiol.* Vol. 56, 2010
- KHAN, M.R., RIZVI, T.F. Nanotechnology: Scope and application in plant disease management. **Plant Pathology Journal**, v.13, n.3, p.214-231, 2014.
- KANHED, P. et al. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. **Materials Letters**, v. 115, p.13–17, 2014.
- KAVEH R, LI YS, RANJBAR S, TEHRANI R, BRUECK CL, VAN AKEN B. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ Sci Technol.* v.18, p. 10637–10644, 2013.

KIM, S.W., JUNG, JH, LAMSAL K, KIM YS, MIN JS, LEE YS. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 40, n.1, p.53–58, 2012.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 3, p. 95–101, 2007.

KRISHNARAJ, C. et al. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.93, 95–99, 2012.

KORDKHEILI, H. Y.; FARSI, M.; REZAZADEH, Z. Physical, mechanical and morphological properties of polymer composites manufactured from carbon nanotubes and wood flour. **Composites Part B: Engineering**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 750–755, 2013.

KUMAR, R.; SHARON, M.; CHOUDHARY, A.K. Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. **Journal of Phytology**, v. 2, n.4, p. 83–92, 2010.

LAMSAL K, KIM SW, JUNG JH, KIM YS, KIM KS, LEE YS Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species in vitro and pepper anthracnose disease in field. **Mycobiology**, v. 39, n.3, p.194–199, 2011 a.

LAMSAL, K.; KIM, S. W.; JUNG, J. H.; KIM, Y. S.; KIM, K.S.; LEE, Y. S. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. **Mycobiology**, v.39, n.1, p.26–32, 2011 b.

LANDA P, VANKOVA R, ANDRLOVA J, HODEK J, MARSIK P, STORCHOVA H, et al. Nanoparticle-specific changes in Arabidopsis thaliana gene expression after exposure to ZnO, TiO<sub>2</sub>, and fullerene soot. **Journal Hazardous Materials**, v. 241–242, p.55–62, 2012.

LIMA, L.M. et al. Relationship between incidence of brown eyespot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. **Journal of Phytopathology**, v.160, p.209–211, 2012.

LIU, C. et al. Characterization of edible corn starch nanocomposite films: The effect of self assembled starch nanoparticles. **Starch Stärke**, Weinheim, v. 67, p. 1–10, 2015.

LIU, D. et al. A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides. **Analytical chemistry**, Washington, v. 84, n. 9, p. 4185–4191, 2012.

LIU, Q., LUO, L., ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International Journal Molecular Sciences**, v. 19, n.2, p. 1–12, 2018

MAGDALANE, C. M. et al. Photocatalytic activity of binary metal oxide nanocomposites of CeO<sub>2</sub>/CdO nanospheres: investigation of optical and antimicrobial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.163, p.77–86, 2016.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p.176–177, 1962.

MALINOVSKY, F.G. FANGEL, J.U., WILLATS, W.G.T. The role of the cell wall in plant immunity. **Front. Plant Science**, v. 178, 2014

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 2012. 889 p.

MATSUMOTO, S.N., CARVALHO, F.M., VIANA, A.E.S., MALTA, M.R., CASTRO, L.G. Initial growth of coffee plants (*Coffea arabica*L.) submitted to different phosphate doses in nutritive solution. **Coffee Science** v. 31, p. 58-67, 2008.

MATTOSO, L. H. C. Rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2005. (Projeto de pesquisa).

MIN, J.S. et al. Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. **Plant Pathology**, v.25, n.4, p.376-380, 2009.

MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Café- Café no Brasil**. < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafes>>. Acesso em: 12 de novembro de 2018

MISHRA, S. et al. Biofabricated Silver Nanoparticles Act as a Strong Fungicide against *Bipolaris sorokiniana* Causing Spot Blotch Disease in Wheat. **PLoS ONE** v.9, n.5, 2014.

MONTEIRO, A.C.A. **Associação de indutores de resistência para manejo da ferrugem do cafeeiro e análises bioquímicas da resposta de defesa induzida**. Universidade Federal de Lavras, Dissertação, 86p., 2011.

NICHOLSON, R.L. & HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p.369-389, 1992.

OCSOY, I. et al. Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. **ACS Nano**, v. 7, n.10, p. 8972–8980, 2013.

OIC- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ.

Disponível em:

<[http://consorcioquesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/relatorio\\_oic\\_dezembro\\_2018.pdf](http://consorcioquesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_dezembro_2018.pdf). >

Acesso em 14 de jun, 2019.

OUDA, S.M. Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on Two Plant Pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. **Research Journal of Microbiology**, 9: 34-42, 2014.

PARK H-J, KIM S-H, KIM H-J, CHOI S-H. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. **Plant Pathology Journal**, v. 22, n.3, p.295–302, 2006.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p.1-51. 1994.

PEREIRA, R.B. et al. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eye spot. **Ciência e agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 383-390, 2012.

PÉREZ-DE-LUQUE, A.; RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest Management Science**. p.65, n.5, p.540–545, 2009.

- PINHEIRO, J. B. et al. Severidade da ferrugem da soja em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 1, p. 43-50, 2011.
- POZZA, A.A.A. et al. Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função de doses de N e de K em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 29-34, 2000.
- POZZA, A.A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; CAIXETA, S.L.; CARDOSO, A.A.; ZAMBOLIM, L.; POZZA, E.A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.1, p.53-60, 2001.
- POZZA, E. A.; CARVALHO, L. V.; CHALFOUN, S. M. Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.
- POZZA E. A ; POZZA A. A. A. Nutrição Mineral no Manejo de Doenças de Plantas. In: Grupo de Estudos Avançados em Fitopatologia (Ed.) **Nutrição no manejo de doenças de plantas**. Viçosa, GEAFIP, p.177-212, 2012.
- PUOCI F. et al. Polymer in agriculture: a review. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 3, p. 299–314, 2008.
- RAJIV, P., RAJESHWARI, S., VENCKATESH, R . Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. **Spectrochim Acta A**, v. 112, p.384–387, 2013.
- RAO, K.J.; Paria, S. Use of sulfur nanoparticles as a green pesticide on *Fusarium solani* and *Venturia inaequalis* phytopathogens. **RSC Advances**. v.3, n.26, p.10471–10478, 2013.
- RESENDE, R.S. et al. Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. **European Journal of Plant Pathology**, v.124, p.533-541, 2009.
- RICO, C. M. et al. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 3485–3498, 2011.
- RODRIGUES, F.A. et al. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. **Phytopathology**, v.94, n.2, p.177-183, 2004.
- ROLSHAUSEN, P.E., GLUBER, W.D. Use of boron for the control of Eutypa Dieback of grapevines. **Plant Disease**, v.89, p.734-738, 2005.
- SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of nanobiotechnology**, Londres, v. 2, n. 1, p. 3, 2004.
- SANGEETHA, J., et al. **Production of bionanomaterials from agricultural wastes**. In: PRASAD, R., KUMAR, M., KUMAR, V. (eds) Nanotechnology. Springer Nature, Singapore, p 33–58, 2017.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.70, n.8, p.1183-1186, 1977.

SOUZA, A.G.C et al. A time series analysis of brown eye spot progress in conventional and organic coffee production systems. **Plant Pathology**, v. 64, p. 157–166, 2015.

SOUZA, A. G. C.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 10, p. 540-546, 2012.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1565-1571, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TANG, S. C. N; LO, I. M. C. Magnetic nanoparticles: essential factors for sustainable environmental applications. **Water research**, Amsterdam, v. 47, n. 8, p. 2613-2632, 2013.

VELMURUGAN, N. et al. Synthesis and characterization of potential fungicidal silver nano-sized particles and chitosan membrane containing silver particles. **Iran. Polymer Journal**, v.18, p. 383–392, 2009.

WANG, Q. et al. The impact of cério oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. **Metallomics**, v. 4 , n.10, p.1105–1112, 2012.

WANG, X. T. et al. High-performance surface-enhanced Raman scattering sensors based on Ag nanoparticles-coated Si nanowire arrays for quantitative detection of pesticides. **Applied Physics Letters**, v. 96, n. 5, p.1-3, 2010.

WAGNER, G. et al. Nanoparticles Composed of Zn and ZnO Inhibit *Peronospora tabacina* Spore Germination in vitro and *P. tabacina* Infectivity on Tobacco Leaves. **Nanomaterials** , v. 6, n.50, p. 1-10, 2016.

WANI, A.H., SHAH, M.A. A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, n.3, p.40–44, 2012.

YADAV, A., YADAV, K. Nanoparticle-Based Plant Disease Management: Tools for Sustainable Agriculture. In: **Nanobiotechnology Applications in Plant Protection**. Abd-Elsalam, K.A., Prasad, R. (Eds). pp 29-61, 2018.

YANG, J., CAO, W., RUI, Y. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 158–169, 2017.

YUAN, D. et al. Uptake and distribution of rare earth elements in rice seeds cultured in fertilizer solution of rare earth elements. **Chemosphere**, v. 43, n. 8, p. 327-337, 2001.

ZOTARELLI, L. et al. Calibração do medidor de clorofila SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, v.9, p.1117-1122, 2003.

## ANEXOS

Anexo A. Análise de variância e coeficientes de variação (CV) para percentual de germinação ensaio 1, percentual de germinação ensaio 2 e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

| FV                    | GL | Quadrado médio |     |                     |                     |
|-----------------------|----|----------------|-----|---------------------|---------------------|
|                       |    | IVCM           | GL  | Germinação ensaio 1 | Germinação ensaio 2 |
| Tratamento            | 5  | 0,9738**       | 6   | 52,27**             | 58,6892**           |
| Dose                  | 4  | 1,9404**       | 4   | 104,01**            | 84,4015**           |
| Tratamento * dose     | 20 | 0,1397**       | 24  | 4,25**              | 5,6534**            |
| Adicional vs fatorial | 1  | 0,2674**       | 1   | 90,49**             | 51,7072**           |
| Resíduo               | 93 | 0,0191         | 108 | 13,457143           | 55,1233             |
| CV                    |    | 29,85          |     | 17,82               | 24,37               |

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Anexo B. Análise de variância e coeficientes de variação (CV) para compostos fenólicos solúveis totais, lignina solúvel, peso da parte aérea seca (PPAS).

| FV         | GL | Quadrado médio         |            |                        |
|------------|----|------------------------|------------|------------------------|
|            |    | fenóis                 | lignina    | PPAS                   |
| Tratamento | 7  | 0,752830**             | 0,396669** | 1,324225 <sup>ns</sup> |
| Bloco      | 3  | 0,189968 <sup>ns</sup> | 0,028228*  | 0,475286 <sup>ns</sup> |
| Resíduo    | 21 | 0,120971               | 0,066253   | 1,162041               |
| CV         |    | 5,65                   | 11,23      | 16,31                  |

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo a 5%, ns -não significativo de probabilidade

Anexo C. Análise de variância e coeficientes de variação (CV) para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice SPAD avaliações 7 dias antes da pulverização dos tratamentos (SPAD 1), 7 dias após a pulverização dos tratamentos (SPAD 2) e 70 dias após a pulverização dos tratamentos (SPAD 3).

| FV         | GL | Quadrado médio          |                        |                        |                        |
|------------|----|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|            |    | AACPD                   | SPAD 1                 | SPAD 2                 | SPAD 3                 |
| Tratamento | 7  | 996,560204*             | 8,673996 <sup>ns</sup> | 6,657882 <sup>ns</sup> | 11,28775 <sup>ns</sup> |
| Bloco      | 3  | 204,98500 <sup>ns</sup> | 4,147417 <sup>ns</sup> | 10,46395 <sup>ns</sup> | 106,76422*             |
| Resíduo    | 21 | 231,862407              | 14,642977              | 10,419407              | 14,770206              |
| CV         |    | 42,71                   | 10,82                  | 7,79                   | 10,24                  |

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo a 5% de probabilidade, ns -não significativo