



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade UnB Planaltina – FUP

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais - PPGCIMA

Jonathan Dias de Lima

Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na agricultura

Brasília-DF

2020

Jonathan Dias de Lima

Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na agricultura

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Faculdade UnB Planaltina da Universidade de Brasília.

Universidade de Brasília – UnB

Faculdade UnB Planaltina – FUP

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais – PPGCIMA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues

Coorientadora: Dra. Diana Fernandez¹

Brasília-DF

Fevereiro/2020

1. Instituto Francês de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD - *Institut de Recherche pour le Développement*)

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

DD541d Dias de Lima, Jonathan
Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas
aplicadas na agricultura / Jonathan Dias de Lima;
orientador Marcelo Oliveira Rodrigues ; co-orientador Diana
Fernandez. -- Brasília, 2020.
52 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência de Materiais)
-- Universidade de Brasília, 2020.

1. C-dots. 2. nanopartículas. 3. nanoformulação. 4.
ferrugem do cafeeiro. 5. nematoides formadores de galhas.
I. Oliveira Rodrigues, Marcelo, orient. II. Fernandez,
Diana, co-orient. III. Título.

Jonathan Dias de Lima

**Desenvolvimento de nanoformulações biopesticidas aplicadas na
agricultura**

A comissão examinadora, abaixo identificada, aprova o trabalho de dissertação de mestrado do curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência de Materiais da Universidade de Brasília-UnB.

Brasília, 19 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues (IQ/ UnB)
Presidente da banca

Prof. Dr. Alex Fabiano Cortez Campos (FUP/UnB)
Membro interno

Dra. Maria Eugênia Lisei de Sá (EPAMIG)
Membro externo

Dr. Franciscarlos Gomes da Silva (IF/ UnB)
Membro suplente

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles
que acreditaram no meu potencial.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus familiares e amigos pelo apoio, amor e carinho desde o início dos meus estudos. À minha mãe Márcia e meu pai Raimundo, por terem me dado à vida e me dado suporte ao longo dos anos. À minha avó, Rita, pela companhia, carinho e apoio nesses últimos anos. A meu namorado Danilo, por ter acompanhado de perto nesses últimos meses do meu mestrado, por todo apoio, amor e respeito. Aos meus amigos, Stefany, André e Luana, que estão juntos comigo já há anos, os quais sabem muito bem o que passei durante a graduação e nessa primeira pós-graduação.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues pelo apoio, liberdade e autonomia de produzir e realizar minhas ideias ao longo desse mestrado. À minha coorientadora Dra. Diana Fernandez pelos seus ensinamentos, companhia e aos achados realizados juntos aos bioensaios realizados na Embrapa. À minha supervisora na Embrapa, Dra. Natália Florêncio Martins pela dedicação, apoio, companhia e autonomia durante o mestrado.

Aos meus amigos e colegas do LIMA, da Embrapa e da UnB por todo aprendizado, amizade e compromisso ao longo dos dias percorridos neste mestrado. Agradeço a prof. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por desde o meu último ano de graduação em Biotecnologia ter me dado à chance de entrar no seu grupo de pesquisa, me inspirado a ser um pesquisador melhor, e todos os ensinamentos, apoio e autonomia desde que me conheceu.

À UnB, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha vida acadêmica; à CAPES, pela bolsa de estudos, a parceria com a Embrapa Cenargen, por ter contribuído com o avanço dos bioensaios.

A todos aqueles que contribuíram e que continuarão a contribuir com o desenvolvimento do projeto.

Resumo

A agricultura é uma das atividades mais antigas da humanidade, tendo como grande desafio na atualidade de desenvolver uma agricultura sustentável aliada à superprodução agrícola. Pragas e doenças de plantas ameaçam a produtividade, por exemplo, causando grandes perdas na produção de algodão, soja, café, tomate e milho no Brasil. A nanotecnologia traz para a agricultura o desenvolvimento de nanobiopesticidas que tem por objetivo servir como agente de tratamento de pragas e, concomitantemente, aumentar a produção. Com isso, o presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de nanoformulações à base de C-dots, que possam ser aplicadas no controle de fitopatógenos de importância econômica ao mercado agroindustrial. Foram produzidas quatro nanoformulações de C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu. Estas foram caracterizadas por técnicas de espectroscopia de fluorescência, infravermelho, microscopia eletrônica de transmissão e os óleos essenciais utilizados nas preparações tiveram suas composições químicas determinadas por GC/MS. As nanoformulações foram testadas em bioensaios contra o fungo *Hemileia vastatrix* (agente da ferrugem alaranjada do cafeeiro) e os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne incognita*). O uso das quatro nanoformulações inibiu em até 100% a germinação de urediniosporos de *H. vastatrix* e a aplicação do nanoformulado C-dots@OECr apresentou a maior taxa de mortalidade das larvas J2 de *M. incognita* (84%). Dessa forma, as nanoformulações desenvolvidas mostraram caráter biopesticida para pragas agrícolas.

Palavras-chave: C-dots, nanopartículas, ferrugem do cafeeiro, nematoides formadores de galhas.

Abstract

Agriculture is one of the oldest activities of mankind and the great challenge today is to develop sustainable agriculture combined with agricultural overproduction. Pests and plant diseases threaten the productivity, for example, causing large losses in the production of cotton, soy, coffee, tomatoes and corn in Brazil. Nanotechnology brings to agriculture the development of nanobiopesticides that aims to serve as a pest treatment agent and at the same time increase production. With this, the present work aims to develop nanoformulations based on C-dots, which can be applied in the control of phytopathogens of economic importance to the agro-industrial market. Four nanoformulations of C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD and C-dots@Cu were produced. These were characterized by fluorescence and infrared spectroscopy techniques, transmission electron microscopy and the essential oils used in the preparations had their chemical compositions determined by GC/MS. The nanoformulations were tested in bioassays against the fungus *Hemileia vastatrix* (agent of the coffee leaf rust) and the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). The use of the four nanoformulations inhibited up to 100% the germination of *H. vastatrix* urediniospores and the application of the C-dots@OECr nanoformulate showed the highest mortality rate of *M. incognita* J2 larvae (84%). Thus, the nanoformulations developed showed a biopesticidal character for agricultural pests.

Keywords: C-dots, nanoparticles, coffee leaf rust, root-knot nematode.

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo biológico da doença ferrugem do cafeeiro (<i>H. vastatrix</i>). Fonte: adaptado da referência 12.	17
Figura 2. Ciclo biológico de nematoides de galhas <i>Meloidogyne spp.</i> Fonte: adaptado da referência 12.....	19
Figura 3. Quantidades (em toneladas de ingredientes ativos) de pesticidas utilizados ou vendidos no setor agrícola para culturas e sementes no mundo. Fonte: referência 31.....	20
Figura 4. Abordagens “top-down” e “bottom-up” para síntese de C-dots. Fonte: adaptado da referência 50.	25
Figura 5. Nanoformulações desenvolvidas: C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu.....	29
Figura 6. Material biológico. A. Plantas de cafeeiro variedade Catuaí de 6 meses usadas neste trabalho. B. (face adaxial) e C. (face abaxial) 14 dias após a inoculação de uma folha do cafeeiro.31	
Figura 7. Testes de germinação de urediniósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> . A. Placa de Petri contendo os discos de folhas de café inoculados. Cada tratamento foi avaliado em triplicata após 24 horas. B. Lâminas de microscópio com os discos das folhas para as análises de germinação.	31
Figura 8. Ensaio de mortalidade de larvas J2 de <i>Meloidogyne incognita</i> em placas de 24 poços....	33
Figura 9. Espectros de fluorescência obtidos do espectrofluorímetro. A. Espectro de emissão de C-dots. B. Espectro de emissão de C-dots@Cu. C. Espectro de emissão de C-dots@OEC.....	35
Figura 10. Espectros de infravermelho das nanoformulações produzidas. Linhas em preto referem-se às nanopartículas de C-dots; linhas em vermelho são as nanoformulações.	36
Figura 11. Estruturas bidimensionais da composição química dos óleos essenciais com suas respectivas fórmulas moleculares. Fonte: PubChem®	39
Figura 12. Resultados obtidos por MET. A. imagem de MET dos C-dots. B. histograma de distribuição da nanopartícula.	39
Figura 13. Avaliação da taxa de germinação de urediniósporos de <i>H. vastatrix</i> com diferentes tratamentos após 24 horas. Controles: C1. água destilada. C2. Recop®. C3. C-dots. C4. OEC. C5. OECr. C6. OELD. C7. nitrato de cobre. Nanoformulações: Nf1. C-dots@OEC. Nf2. C-dots@OECr. Nf3. C-dots@OELD. Nf4. C-dots@Cu. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão da média.. 40	
Figura 14. Avaliação da germinação de urediniósporos de <i>H. vastatrix</i> com distintos tratamentos, após 24 horas. A. controle negativo (água destilada). B. controle positivo (Recop®). C. C-dots@OEC. D. C-dots@OECr. E. C-dots@OELD. F. C-dots@Cu.	41
Figura 15. Avaliação da taxa de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. incognita</i> com diferentes tratamentos após 24 horas. Controles: C1. água destilada. C2. abamectina. C3. C-dots. C4. OEC. C5. OECr. C6. OELD. C7. nitrato de cobre. Nanoformulações: Nf1. C-dots@OEC.	

Nf2. C-dots@OECr. Nf3. C-dots@OELD. Nf4. C-dots@Cu. As médias seguidas pela letra a não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As médias seguidas pelas letras b, c diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão da média..... 42

Figura 16. *Avaliação da mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* com diferentes tratamentos, após 24 horas. A. controle negativo (água destilada). B. controle positivo (abamectina). C. C-dots. D. C-dots@OECr. 43*

Índice de tabelas

<i>Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de citronela (OEC), cravo (OECr) e laranja doce (OELD), determinada por GC/MS.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 2. Estatística aplicada aos bioensaios realizados com as nanoformulações.....</i>	<i>41</i>

Lista de abreviaturas e siglas

FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
CLR	doença ferrugem, do inglês <i>coffee leaf rust</i>
RKN	nematoides formadores de galhas, do inglês <i>root-knot nematodes</i>
OEs	óleos essenciais
LD ₅₀	dose letal mediana
EUA	Estados Unidos da América
COMTRADE	Banco de Dados de Estatísticas do Comércio de Mercadorias das Nações Unidas, do inglês <i>United Nations Commodity Trade Statistics Database</i>
NPs	nanopartículas
NMC	nanomateriais a base de carbono
C-dots	Carbon dots (ou CDs ou Quantum dots de carbono)
IV	espectroscopia na região do infravermelho
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
XPS	espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
J2	juvenil de segundo estágio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Agricultura	13
1.2	Ferrugem	15
1.3	Nematoides	18
1.4	Pesticidas	20
1.5	Óleos essenciais	21
1.6	Nanotecnologia	22
1.7	Nanomateriais de carbono	24
1.8	Nanopesticidas	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Materiais	28
3.2	Síntese de nanopartículas	28
3.3	Preparação das nanoformulações	28
3.4	Caracterizações	29
3.4.1	Espectroscopia de fluorescência	29
3.4.2	FTIR	29
3.4.3	MET	29
3.4.4	GC/MS	30
3.5	Bioensaios	30
3.5.1	Ensaio da ação fungicida	30
3.5.2	Ensaio da ação nematicida	32
3.6	Análise estatística	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Caracterizações	34
4.2	Bioensaios	40
5	CONCLUSÃO	44
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8	ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agricultura

O crescimento das primeiras civilizações está ligado diretamente ao desenvolvimento da agricultura pela humanidade, apresentando uma nova opção de manutenção da alimentação por meio de cultivos de plantas e criação de animais. Por volta de 5000 a.C., os primeiros agricultores se estabeleceram numa área fértil ao sul da Mesopotâmia, conhecida, então, como Suméria, dando início à primeira grande civilização do mundo [1].

A agricultura é a atividade humana que mais utiliza áreas de terra e água para o seu desenvolvimento em todo o mundo. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), o uso da terra para produzir bens e serviços é presente em, praticamente, todos os continentes da Terra [2]. Desde o início das sociedades humanas, a agricultura proporcionou a ascensão da civilização com a criação de espécies domesticadas de plantas utilizando grandes áreas de cultivo, o que permitiu o convívio das pessoas nas cidades [1].

Com o aumento da população mundial, a produtividade de produtos advindos do setor agropecuário precisou ultrapassar valores nunca antes alcançados. Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2017, a lavoura de soja obteve o maior valor de produção no país (103 milhões de toneladas de grãos produzidos), seguida de cana-de-açúcar, milho e café. Para atingir essa produção foram utilizados 351 milhões de hectares de área de estabelecimentos agropecuários e 15 milhões de pessoas ocupadas com atividades envolvidas neste setor [3]. Atualmente, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o terceiro levantamento da safra 2019/20 de grãos sinaliza uma produção de 251,1 milhões de toneladas de grãos, com aumento de 3,8% sobre a safra 2018/19, mostrando um novo recorde da produção agroindustrial brasileira [4].

O almejo do desenvolvimento de uma agricultura sustentável já existe há alguns anos, tendo por finalidade atender às necessidades alimentares e têxteis da sociedade no presente, sem comprometer as necessidades das gerações futuras [5]. Esse modelo de agricultura está versado nos princípios de saúde ambiental, rentabilidade econômica e

equidade social, sendo sua premissa principal a diminuição dos impactos socioambientais da agricultura no meio ambiente por intermédio de inovações no setor e redução de insumos introduzidos [6].

A adoção de um sistema agrícola verdadeiramente sustentável em larga escala é a melhor solução para enfrentar o desafio de alimentar uma população em crescimento que deve chegar a 9 bilhões de pessoas até 2050, enquanto se protege o meio ambiente [7]. Preocupações com a insustentabilidade da agricultura convencional promoveram interesse em outros sistemas agrícolas, como a agricultura orgânica. Segundo a FAO, agricultura orgânica é um sistema holístico de gerenciamento da produção agrícola que promove a melhoria na saúde do agro ecossistema, no qual enfatiza o uso de práticas de manejo preferencialmente ao uso de insumos extra-agrícolas (do inglês, *off-farm inputs*), tais como fertilizantes e agroquímicos [8].

Mesmo que haja muitas críticas em relação à agricultura intensiva (do tipo convencional), ainda é o tipo de agricultura mais predominante no mundo, detendo mais de 90% do mercado [6, 14]. Tem-se como perspectiva, uma combinação das práticas e ideais da agricultura orgânica nos sistemas de agricultura convencional para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e que continue a alcançar máxima produtividade com excelente qualidade dos seus produtos [14].

A agricultura é uma importante atividade econômica, social e cultural, sendo altamente sensível às variações climáticas e ao aquecimento global. Tais fatores podem comprometer a execução e o desempenho dos serviços agrícolas e na geração dos produtos em pequena e grande escala [9]. A indústria agrícola apresenta demandas relacionadas à infraestrutura e prática de manejo das culturas para que o crescimento populacional mundial não comprometa a produção em termos de qualidade e quantidade [10]. Outro aspecto preocupante envolve a crescente necessidade do uso de fertilizantes, etapa que encarece a produção agrícola, tendo por possível solução, nos tempos atuais, a utilização de nanofertilizantes que auxiliam em uma maior distribuição de micro e macronutrientes e uma entrega controlada desses nutrientes na planta [11].

Desde o estabelecimento das práticas agrícolas na Mesopotâmia, pragas e doenças de plantas têm ameaçado os cultivos dos agricultores, causando danos ou destruição completa das propriedades, além de ameaçar a segurança alimentar, perturbar as economias rurais e prejudicar as relações comerciais [12]. De acordo com a FAO, praga é qualquer

espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos às plantas ou aos seus produtos [13]. São consideradas pragas os animais, bactérias, fungos e ervas daninhas que podem se proliferar devido ao ambiente favorável e comprometer as culturas agrícolas [12].

As doenças de plantas são causadas por bactérias, vírus, fungos ou nematoides e podem variar em gravidade, desde danos leves a folhas ou frutos até a morte [12]. Alguns patógenos causam doenças por meio do crescimento e multiplicação nos vasos do xilema ou floema das plantas. Segundo Savary e colaboradores (2019), em escala global, patógenos e pragas são responsáveis por perdas na produção de trigo de 10 a 28%, de arroz de 25 a 41%, de milho de 20 a 41%, de batata de 8 a 21% e de soja de 11 a 32% [14].

O combate a pragas e doenças de plantas é uma necessidade para a agricultura e as decisões sobre o controle destes são tomadas por cada agricultor, porém a presença de uma praga ou doença em uma determinada localidade representa uma ameaça para regiões adjacentes e distantes [7]. Assim, pragas e doenças implicam em impactos negativos a terceiros e exigem uma resposta adicional, das partes afetadas ou do governo. O desafio principal é reduzir as perdas na produção devido às patologias vegetais e, ao mesmo tempo, poupar o meio ambiente [14]. Assim, controlar de maneira eficaz e segura as pragas e doenças de plantas é um dos principais objetivos de centros de pesquisa e empresas [12].

1.2 Ferrugem

Os fungos e oomicetos tipo fungo são uma das grandes ameaças aos outros seres eucariontes integrantes do domínio *Eukarya*, sendo que as doenças de plantas causadas por eles alteraram a história da humanidade diversas vezes [15]. Por exemplo, o caso da Grande Fome na Irlanda (do inglês, *Great Famine*), em que o patógeno *Phytophthora infestans* infectou as culturas de batata de toda a Europa durante a década de 1840, causando a morte de 1 milhão de pessoas na ilha [16].

As ferrugens de plantas são causadas pelos basidiomicetos da ordem *Uredinales*, que estão entre as doenças mais destrutivas das plantas. Existem cerca de 5.000 espécies de fungos da ferrugem, os quais atacam principalmente folhas e caules e as infecções são caracterizadas pelo aparecimento de manchas de cor laranja, amarelo e branco que rompem a epiderme. Estes fungos são notórios por sua destrutividade nas lavouras de grãos, especialmente trigo, aveia, cevada e café [12].

O café é o segundo produto comercializado (*commodity*) mais valioso do mundo, precedido apenas pelo petróleo [17]. De acordo com a Organização Internacional do Café (ICO, do inglês *International Coffee Organization*), a produção de café no mundo durante o período de 2018/19 aumentou em cerca de 2%, totalizando 169 milhões de sacas, liderada por um aumento de 18% na produção brasileira, tornando o Brasil o maior produtor mundial do grão [18]. Sabendo da importância do consumo e venda de café em todo o mundo, a produção do grão pode ser comprometida em até 20% por diversas doenças que atacam o ciclo de produção do cafeeiro, sendo as principais doenças a ferrugem, a cercosporiose, a mancha manteigosa, a queima do fio, a roseliniose e os nematoides formadores de galhas [12].

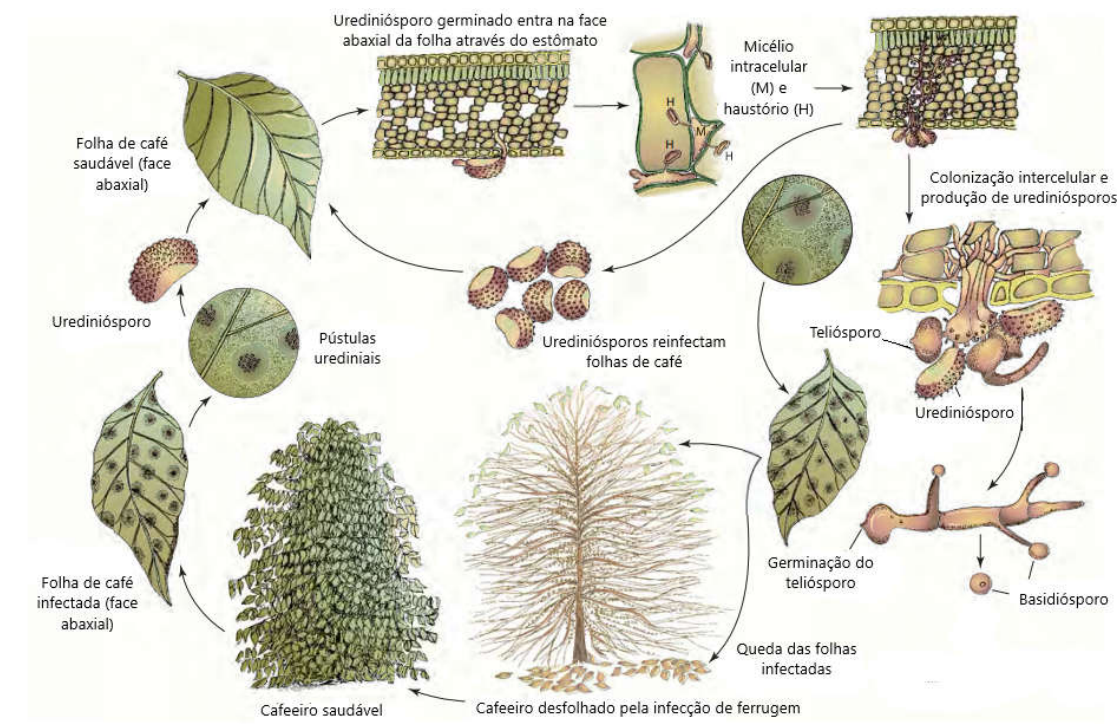
A doença ferrugem (do inglês, *coffee leaf rust*, CLR) é causada pelo fungo biotrófico obrigatório *Hemileia vastatrix* (*Basidiomycota*, ordem *Pucciniales*), descrito pela primeira vez em 1869 por Berkeley & Broome no Ceilão (atual Sri Lanka), onde destruiu toda a produção de café [19]. Após esse episódio devastador, a ferrugem se tornou uma das doenças mais conhecidas da patologia vegetal, além de ser a principal patologia que acomete as culturas de café, causando perdas superiores a US\$ 1 bilhão por ano e interferindo na produção de café arábica (*Coffea arabica* L.) [12, 19].

No Brasil, a doença foi reportada pela primeira vez em 1970 em cultivares de *C. arabica* localizados na região sul da Bahia e, posteriormente, foi confirmada a sua presença em praticamente todos os cafeeiros do país, poucos meses depois. Atualmente, a doença está presente em praticamente todos os cafeeiros do tipo arábica e conilon (*Coffea canephora*), além de continuar ameaçando a produção de café no país com perdas variando de 30-70% [20, 21].

Como representado na **Figura 1**, o ciclo biológico da ferrugem em folhas de café envolve eventos específicos, incluindo adesão à superfície do hospedeiro, germinação de urediniósporos de *H. vastatrix*, penetração e colonização inter e intracelular. Os urediniósporos se espalham facilmente carregados pelo vento, chuva e animais e germinam apenas na presença de água e em temperaturas variando entre 21-25°C, na ausência de luz. Estes entram nas folhas através dos estômatos e do micélio e crescem entre as células vegetais. Com a nova produção de urediniósporos, a queda prematura das folhas infectadas pode ocorrer a qualquer momento, resultando no enfraquecimento das plantas e em

rendimentos reduzidos da produção de café e, em casos severos, leva a morte do cafeeiro [12, 19, 20].

Figura 1. Ciclo biológico da doença ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*). Fonte: adaptado da referência 12.



Os sintomas da doença surgem na face abaxial das folhas e são notados como uma descoloração e posterior produção de pústulas alaranjadas na superfície das folhas (entre 10-25 dias do início da infecção). Estas pequenas manchas alaranjadas (de 1 a 3 mm de diâmetro) se expandem (até 20 mm de diâmetro) no lado abaxial das folhas, onde são produzidos urediniósporos alaranjados em pó. Aparecem também manchas amarelas cloróticas na face adaxial das folhas, as quais se tornam necróticas [20].

Desde o aparecimento da doença, tem-se buscado formas de controlar a mesma, seja por meio da resistência natural à ferrugem e a criação de variedades resistentes [19, 20, 22]. No entanto, o controle genético da ferrugem tem sido dificultado devido à grande diversidade patológica e rápida evolução genética do fungo [19]. O controle da doença pode ser alcançado com eficiência através do uso de agroquímicos, incluindo fungicidas à base de cobre e fungicidas sistêmicos [12]. Porém, a toxicidade ambiental e a não seletividade desses compostos químicos são fatores limitantes dos seus usos nos cultivares de café.

A busca por formas eficientes e seguras de controle da doença ferrugem é o que a agroindústria necessita no presente momento. Desenvolver compostos e/ou moléculas que

possam atuar em alvos moleculares específicos de patógenos sem promover toxicidade para o hospedeiro e o meio ambiente são alguns dos objetivos do controle de patógenos vegetais atualmente [19, 20].

1.3 Nematoides

Os nematoides são animais invertebrados pertencentes ao filo *Nematoda*, abundantes como parasitas ou na forma de vida livre no solo e em ambientes aquáticos. São animais de aparência de tipo verme, de corpo cilíndrico, alongado e não segmentado, e que se alimentam de microrganismos, plantas e animais. As doenças de plantas são causadas por diversas espécies de fitonematoides que atacam e parasitam majoritariamente as raízes das plantas vivas. A cavidade bucal transformada em estilete capacita a entrar na raiz e se alimentar diretamente das células vegetais [12].

Nematoides parasitas de plantas (NPPs) são responsáveis por uma redução estimada em 10% na produção agrícola mundial, representando um dos grandes patógenos de plantas que a agroindústria necessita controlar [64]. Fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoides formadores de galhas (do inglês, *root-knot nematodes*, RKN), são as pragas agrícolas mais prejudiciais que atacam diversas culturas e podem causar perdas drásticas de rendimento, principalmente na agricultura tropical e subtropical, com perdas anuais estimadas em mais de US\$ 150 bilhões [29]. No Brasil, as principais espécies desses fitonematoides são *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. enterolobii* e *M. ethiopica* [25].

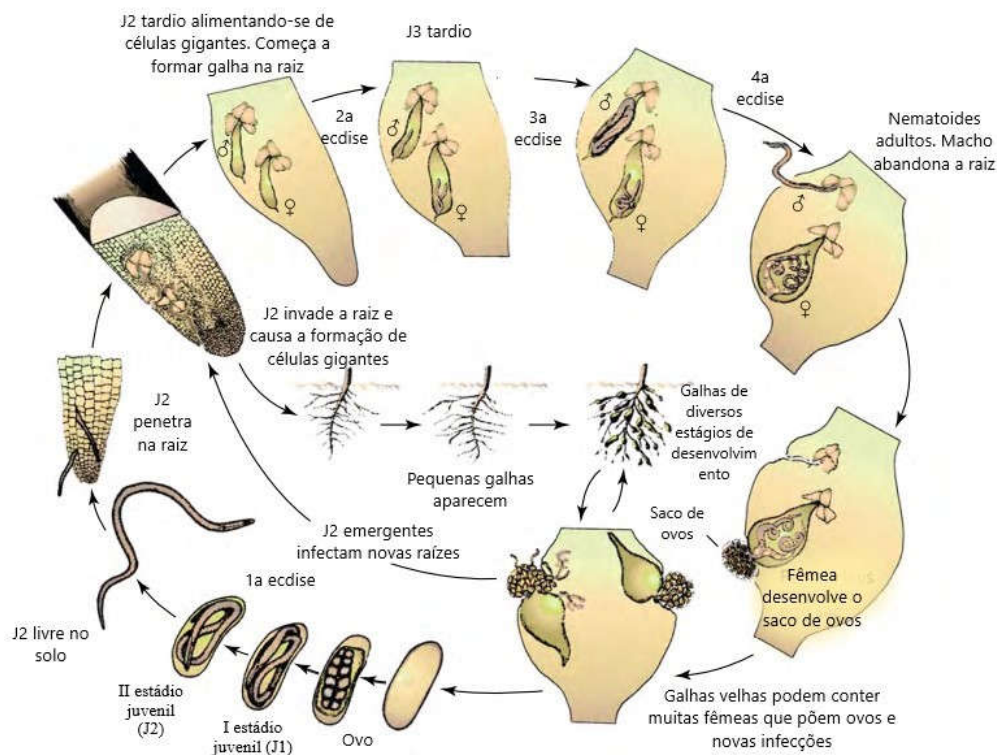
Meloidogyne incognita é uma das espécies de fitonematoides mais importantes economicamente por parasitar mais de 3000 culturas agrícolas, além de predispor a planta hospedeira à invasão de patógenos secundários, resultando em perdas significativas na produtividade [26]. *M. incognita* é um parasita biotrófico obrigatório que infesta plantas monocotiledôneas, dicotiledôneas, herbáceas, lenhosas e outras [23], tais como culturas de algodão [27], café [26] e tomate [28].

Os sintomas da doença são percebidos como crescimento anormal das plantas hospedeiras, sintomas de deficiência de nutrientes, baixo ou nulo desenvolvimento de flores e frutos, e outras deformações. Nas raízes infectadas se desenvolvem galhas típicas de fitonematoides, que são o dobro do diâmetro de uma raiz saudável. Os nematoides de galhas são diferentes morfológicamente, sendo que os machos medem cerca de 1,5 mm de

comprimento por 35 μm de diâmetro, enquanto as fêmeas têm formato de pera e medem cerca de 0,8 mm de comprimento por 0,65 mm de largura [12].

O ciclo biológico de nematoides de galhas envolve o ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e o estágio adulto (**Figura 2**). O ciclo de vida das espécies de *Meloidogyne* começa quando o primeiro estágio juvenil (J1) sofre a primeira muda (ecdise) no interior do ovo e eclode no estágio J2 (variante infectante), ficando livre no solo. Após penetrar na raiz, o J2 migra ao longo da raiz até encontrar um local adequado para estabelecer seu local de alimentação, ocasionando na formação das chamadas células gigantes (galhas). Em seguida, o nematoide sofre três mudas subsequentes para atingir a idade adulta (macho ou fêmea). Cada fêmea pode depositar até 500 ovos [12].

Figura 2. Ciclo biológico de nematoides de galhas *Meloidogyne* spp. Fonte: adaptado da referência 12.



O controle de fitonematoides tem sido feito por meio de nematicidas conhecidos [26, 27], porém devido à alta toxicidade ao meio ambiente e à saúde humana atribuída ao uso desses produtos, muitos foram retirados do mercado [29]. Métodos alternativos de controle têm sido buscados por diversos pesquisadores, incluindo o uso de cultivares resistentes e plantas transgênicas, sanitização, rotação de culturas e o controle biológico [24]. Mesmo com todos esses esforços mencionados, assim como no caso da ferrugem do

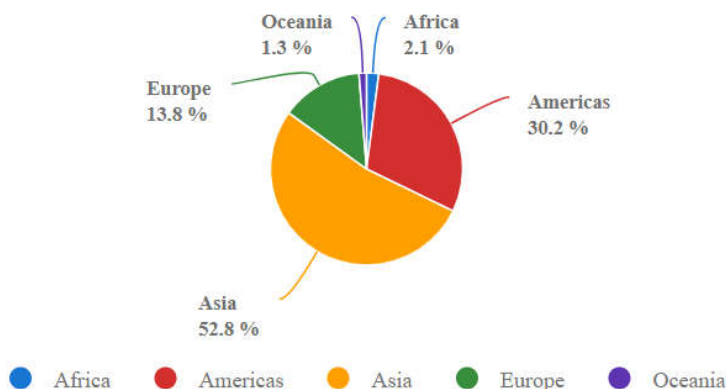
café, o controle da doença causada por nematoides de galhas é um dos grandes desafios a serem resolvidos na agroindústria [23, 24, 29].

1.4 Pesticidas

A proteção das lavouras agrícolas contra pragas de plantas e das doenças associadas a essas é realizada por meio da utilização de pesticidas, os quais são uma necessidade frente ao crescimento exponencial da agricultura atual. Pesticidas são compostos químicos projetados para controlar pragas e patógenos de plantas, existindo um tipo de pesticida para cada praga específica, incluindo: herbicidas, inseticidas, antimicrobianos, fungicidas, biopesticidas, repelentes de animais e outros [30].

Segundo dados da FAO, o consumo mundial de pesticidas é de cerca de quatro milhões de toneladas por ano, dos quais 14% são usados somente na Europa, 30% são consumidos nos países americanos, 1% na Oceania, 2% na África e o maior consumo na Ásia com 53% (**Figura 3**) [31].

Figura 3. Quantidades (em toneladas de ingredientes ativos) de pesticidas utilizados ou vendidos no setor agrícola para culturas e sementes no mundo. Fonte: referência 31.



A aplicação extensa de pesticidas na agricultura está associada à prevenção e/ou remediação de perdas nas colheitas para pragas e, conseqüentemente, ao aumento do rendimento. No entanto, seu uso está vinculado à toxicidade ao meio ambiente, contribuindo para a presença de material tóxico na superfície do solo e águas subterrâneas, podendo ser tóxico para a saúde das plantas e dos animais [32]. O sufixo *-cida* da palavra pesticida indica que este é desenhado com o intuito de matar algo que se pretende controlar, sendo assim, todos são tóxicos ou venenosos contra as pragas para serem eficazes.

Os riscos à saúde resultantes da exposição aos pesticidas são determinados não apenas pela toxicidade do produto, mas também pela duração e quantidade de tempo de

exposição. Os pesticidas são importantes no controle de pragas, com uma seleção correta do produto e a sua utilização, de acordo com o rótulo, deve conter informações para maior segurança do trabalhador, das culturas e a saúde do ambiente ao seu redor [33].

No Brasil, utiliza-se o termo “agrotóxico” para se referir a pesticidas utilizados na agricultura de forma geral. Tal palavra possui tom pejorativo aos compostos químicos, uma vez que transforma todos os pesticidas em venenos em qualquer dose e/ou concentração, assustando pessoas leigas, além de tentar promover o mercado de produtos orgânicos (os quais usam pesticidas de forma direta ou indireta). O projeto de lei nº 6.299/2002, que tramita no Congresso Nacional, tenta substituir o termo dos documentos oficiais e das embalagens dos produtos mandatoriamente por “pesticida”, “defensivo agrícola” ou “defensivo fitossanitário” [34].

Pensando em alternativas a serem utilizadas no controle de pragas, ao invés de pesticidas químicos tradicionais, há em protagonismo o uso de biopesticidas, os quais contêm agentes de biocontrole como organismos naturais ou substâncias derivadas de seres vivos (como bactérias, fungos, plantas ou animais), incluindo seus genes e/ou metabólitos. Tais compostos podem ser classificados em: pesticidas microbianos, protetores incorporados em plantas (PIPs) e pesticidas bioquímicos [35].

Os pesticidas bioquímicos referem-se a produtos químicos que são total ou parcialmente derivados de fontes biológicas, como por exemplo, metabólitos, hormônios, extratos de plantas e reguladores naturais de crescimento de insetos [30, 35]. Ao contrário dos agroquímicos tradicionais, estes biopesticidas fazem o controle das pragas por mecanismos não tóxicos e não precisam matar diretamente as pragas, mas podem controlar sua multiplicação e prevenir o desenvolvimento do ciclo biológico, além de serem mais específicos [35, 11].

1.5 Óleos essenciais

No decorrer da evolução, as plantas conseguiram se adaptar ao ataque de pragas por intermédio do desenvolvimento natural de pesticidas. Especialmente os óleos essenciais (OEs), os quais são extratos de plantas de natureza hidrofóbica, possuem diversas aplicações como biopesticidas [37]. OEs são misturas complexas formadas, principalmente, de alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos. São materiais voláteis presentes em plantas, que possuem odor e fragrância característica [38].

OEs são encontrados nos órgãos vegetais (em seus aparatos secretores) e estão associados à sobrevivência das plantas em seu ecossistema, realizando função principal de

defesa contra pragas e predadores, assim como na atração de insetos e outros agentes fecundantes. Os aparatos secretores são encontrados, principalmente, nas folhas, flores, raízes e nos caules [40].

Os OEs podem ser caracterizados por meio da sua volatilidade, insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos, além de permitir o seu isolamento. Estes podem se apresentar na forma de líquidos oleosos com aromas agradáveis e intensos. O aroma é resultado de complexas interações que ocorrem entre os diversos componentes destes extratos, sendo complicada e difícil a reprodução da fragrância natural [38, 40].

Diversos fatores podem influenciar na qualidade da produção dos óleos essenciais, entre eles estão os genéticos, os ambientais (como temperatura, luz, solo, latitude e altitude), além de interferir também a época e forma de colheita, espaçamento, transporte, secagem, armazenamento do material vegetal. Assim como na produção de OEs, as suas aplicações são restringidas devido às características como volatilidade, termo e fotosensibilidade, oxidação, solubilização mediada por solventes orgânicos e outras [40].

Na literatura diversos trabalhos mostram a aplicação de OEs como biopesticidas. Elo e colaboradores (2019) testaram a atividade nematicida de 10 óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas aclimatadas no Togo (África), sendo que deste teste *in vitro* as amostras mais potentes foram *Ocimum sanctum* ($LD_{50} = 282 \pm 53 \text{ mg.L}^{-1}$), *Cymbopogon schoenanthus* ($LD_{50} = 288 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}$) e *Cinnamomum zeylanicum* ($LD_{50} = 355 \pm 126 \text{ mg.L}^{-1}$) [37].

Osório e colaboradores (2018) avaliaram o efeito dos OEs de capim-limão, citronela, chá mexicano e noni na germinação por urediniósporos de *Olivea neotectonae*, o agente responsável pela ferrugem em teca (*Tectona grandis* L.f.). Descobriram que os OEs de noni e capim-limão inibiam 100% de germinação de urediniósporos nas concentrações de 2000 e 1500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ [39].

De acordo com dados da COMTRADE (*United Nations Commodity Trade Statistics Database*), os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo em 2018 foram os EUA (US\$ 1 bilhão), França (US\$ 500 milhões), Alemanha e Índia (US\$ 400 milhões). O Brasil aparece entre os principais países fornecedores dos óleos essenciais de laranja, limão, lima e outros cítricos (US\$ 400 milhões) [41].

1.6 Nanotecnologia

Nanotecnologia é um dos pilares tecnológicos do século XXI, sendo uma área em que se cria, caracteriza, desenvolve e aplica estruturas, materiais, dispositivos e técnicas por

meio do controle da matéria em nível nanométrico (10^{-9} metro) [42]. A nanotecnologia é uma nova tendência da ciência que está sendo utilizada mundialmente para solucionar problemas em diversas áreas, abrangendo vários mercados como agricultura, medicina, indústria farmacêutica, entre outros. Compreende as etapas tecnológicas que envolvem o desenho, produção, caracterização e aplicação de materiais, estruturas, ferramentas e sistemas por controle de tamanho e forma em escala nanométrica (<100nm) [43].

A principal finalidade da nanotecnologia é criar materiais, dispositivos e sistemas com novas propriedades e funções, fundamentados em sua estrutura. Materiais em escala nanométrica, por exemplo, nanopartículas (NPs), nanofibras, nanotubos de carbono (NTCs), representam o desenvolvimento e aplicação dos novos materiais avançados [44]. Os nanomateriais são uma nova classe de materiais com propriedades únicas que permitem amplas aplicações: dispositivos eletrônicos, aplicações biomédicas, imageamento seletivo, biosensores, formulações farmacêuticas e como matéria prima na indústria alimentícia, têxtil, cosmética, esportiva, entre outras [44, 45].

Desde o final do século XX se fala em desenvolver uma química verde (do inglês, *Green Chemistry*), em que se pretendia reduzir ou eliminar o uso ou geração de qualquer substância perigosa proveniente da criação, manufatura e aplicação de químicos. No mundo atual, há um engajamento na utilização de materiais sustentáveis, que desenvolvam produtos eco amigáveis (*eco-friendly*) e não tóxicos para animais, e que consigam máxima eficiência na sua atuação [46].

Com a chamada Revolução Verde (do inglês, *Green Revolution*), a agricultura teve que ser aprimorada com a implantação de inovações tecnológicas no setor, por meio da utilização de fertilizantes, pesticidas, sistemas de irrigação e outros, com o intuito de se aumentar a produção frente ao crescimento populacional [47].

A Revolução Verde no século XXI estabelece o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, em que um novo padrão de produção que não agrida o meio ambiente é priorizado, com aumento na produtividade agrícola [47, 11]. Assim, a nanotecnologia pode auxiliar na resolução dos problemas decorrentes do uso de pesticidas químicos tradicionais, por exemplo, com o desenvolvimento de formulações em escala nano com agentes bioativos, os chamados nanobiopesticidas.

1.7 Nanomateriais de carbono

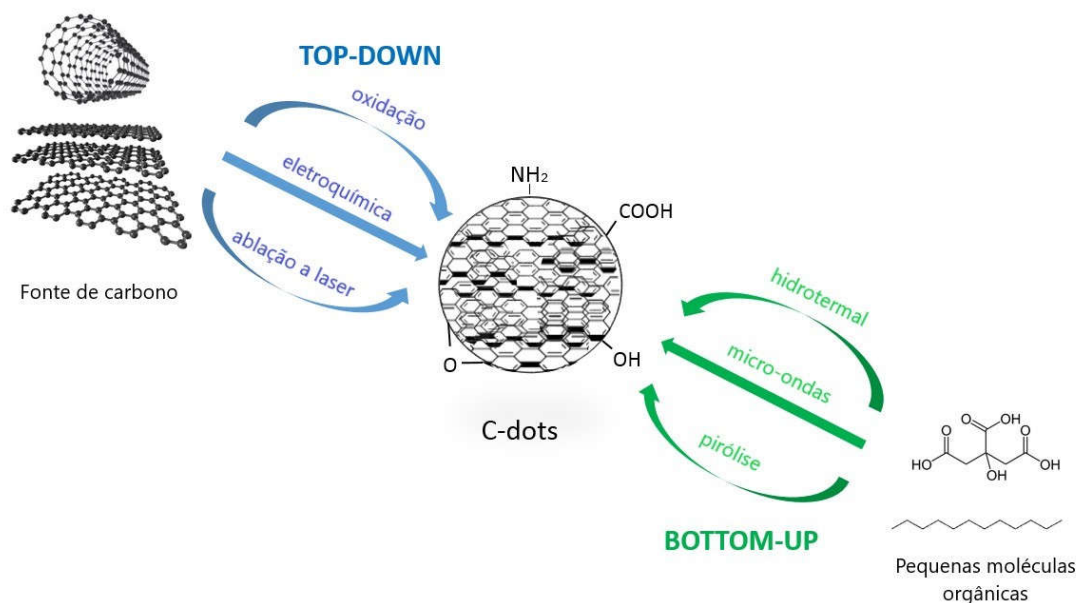
Entre os materiais de grande interesse e aplicabilidade atual encontram-se aqueles nanomateriais à base de carbono (NMC), como por exemplo, nanotubos, C-dots, Quantum dots (Q-dots). Carbon dots (C-dots) são nanomateriais fluorescentes à base de carbono, os quais ganharam bastante destaque na área de nanotecnologia nos últimos anos devido às suas propriedades atrativas, tais como luminescência, inércia química, excelente biocompatibilidade, fácil síntese, alta estabilidade aquosa, baixo custo, eco amigáveis, baixa ou nenhuma toxicidade, entre outros [48].

Nanomateriais fluorescentes à base de carbono, de tamanho menor que 10 nm, são os chamados Carbon dots (CDs ou C-dots), que foram sintetizados pela primeira vez por Xu e colaboradores em 2004, durante a purificação de nanotubos de carbono de parede única [49]. C-dots são, geralmente, nanopartículas quase esféricas constituindo material amorfo a nano cristalino e sempre consistem em carbono sp^2/sp^3 e grupos funcionais baseados em oxigênio/nitrogênio ($-COOH$, $-NH_2$, e $-OH$) na superfície [50].

C-dots podem ser obtidos usando diversos métodos sintéticos (**Figura 4**) e fontes de carbono (ácido cítrico, pólen, açúcar, alho e outros). Os métodos sintéticos podem ser classificados em dois grandes grupos: métodos “*top-down*”, com materiais de grafite como fonte de carbono e métodos “*bottom-up*”, com moléculas orgânicas como fontes de carbono. As abordagens *top-down* incluem ablação a laser, eletroquímica e oxidação, nas quais envolvem a decomposição de uma fonte de carbono sob condições relativamente adversas em C-dots. Já as abordagens *bottom-up*, os C-dots são sintetizados a partir de pequenas moléculas contendo carbono em um processo de “carbonização”, que pode ser realizado por micro-ondas/ultrassom, hidrotermal e pirólise [48, 49].

A desvantagem das abordagens *top-down*, no entanto, é que elas exigem condições severas de reação, tempos longos de processamento, materiais e equipamentos caros. Contrapondo isso, C-dots podem ser sintetizados de forma fácil, rápida e com custo barato utilizando as abordagens *bottom-up*, tais como o método hidrotermal que as moléculas precursoras são carbonizadas em soluções aquosas a altas temperaturas (tipicamente, entre 150 a 200° C) sob alta pressão de vapor [48, 49, 50].

Figura 4. Abordagens “top-down” e “bottom-up” para síntese de C-dots. Fonte: adaptado da referência 50.



Na literatura, várias publicações relatam o incrível potencial dos C-dots para diversas aplicações, incluindo bioimagem, nanocarreadores, supercapacitores, biosensores, *cell labeling* e terapêutica [48, 49]. Assim, os C-dots surgiram como um nanomaterial versátil para ser utilizado para solucionar diversas demandas, de acordo com a propriedade a ser explorada na aplicação.

Desde que diversos estudos demonstraram o elevado desempenho de C-dots em vários processos fisiológicos de plantas, como crescimento, fotossíntese e resistência a estresse abiótico/biótico, estes nanomateriais tem atraído cada vez mais atenção do meio acadêmico e industrial [51].

1.8 Nanopesticidas

Há anos acreditava-se que a nanotecnologia deveria ser usada na agricultura apenas no aumento do manejo e conservação de insumos nas culturas, na produção animal e na pesca, refletindo nas melhores práticas agrícolas [49, 51]. Recentemente, o escopo de aplicação tem sido ampliado, visando a melhorar a proteção das culturas através da remediação de pesticidas químicos tradicionais e na preparação de nanoformulações com pesticidas (nanopesticidas), a fim de facilitar a aplicação e a entrega controlada nas plantas [52].

Nanomateriais representam novas armas no controle de fitopatógenos de interesse econômico para a agricultura mundial, principalmente, com o advento dos nanopesticidas [53]. São diversos os mecanismos de ação dos nanopesticidas no combate a fitopatógenos, como dano na estrutura da parede e membrana celular, inibição da germinação de esporos, *down*-regulação de genes de patogenicidade, deformações e interrupção do ciclo celular, geração de espécies reativas de oxigênio, inibição da replicação de DNA e acidificação do meio intracelular [53].

Nanobiopesticidas são compostos biologicamente ativos nanoformulados, em que a eficiência da molécula biotiva é potencializada devido à nanopartícula utilizada na construção da nanoformulação. Uma vez que a nanopartícula utilizada pode auxiliar na solubilização, termo e foto estabilidade, concentração e entrega ao sítio alvo das moléculas bioativas. Trata-se de um novo tipo de biopesticida, que possui propriedades inerentes, como liberação orientada ao alvo, não degradação de moléculas bioativas, aumento da solubilidade de compostos ativos pouco solúveis e diminuição da dose aplicada nos cultivos para controlar pragas agrícolas [54].

Para superar os diversos desafios do uso de OEs como novos biopesticidas, uma proposta de nanoformular esses os compostos bioativos presentes nos OEs com C-dots, é uma abordagem a ser utilizada e pesquisada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver nanoformulações com o uso de C-dots que possam ser aplicadas no controle de fitopatógenos de importância econômica ao mercado agroindustrial.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar de C-dots a partir de uma fonte de carbono convencional e utilizar uma rota sintética simples.
- Desenvolver as nanoformulações de C-dots com moléculas bioativas de interesse, tais como geraniol, citronelal, citronelol, limoneno e eugenol.
- Testar as nanoformulações preparadas em bioensaios contra os fitopatógenos da ferrugem do cafeeiro (*H. vastatrix*) e os nematoides formadores de galhas (*M. incognita*).
- Explorar as características físicas e químicas das nanopartículas e das nanoformulações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes ácido cítrico, nitrato de cobre (II), ureia, DMSO e abamectina (96% pureza) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (EUA). Oxicloreto de cobre (II), Recop[®] foi adquirido da empresa Atanor (Brasil). Hexano (96% pureza) foi adquirido da empresa Neon (Brasil).

Óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon winterianus*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e laranja doce (*Citrus aurantium*) 100% puros foram adquiridos da empresa AMANTIKIR Origem Natural[©] (Minas Gerais, Brasil).

3.2 Síntese de nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas no Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA – IQ/UnB) utilizando como método a síntese hidrotermal. O processo de síntese dos C-dots utilizados está presente na patente depositada recentemente (**BR1020200021796**). Resumidamente, C-dots foram sintetizados utilizando ácido cítrico, ureia e água destilada, os quais são adicionados em um reator autoclave de aço inoxidável revestido de teflon para síntese hidrotermal. A reação é mantida por 4 horas a 200° C em uma estufa e a solução resultante é purificada e, em seguida, o material é secado na estufa a 100° C.

3.3 Preparação das nanoformulações

C-dots, nitrato de cobre e óleos essenciais de citronela (OEC), cravo (OECr) e laranja doce (OELD) foram utilizados nas preparações das formulações nanobiopesticidas. Foram produzidas quatro nanoformulações: C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu (**Figura 5**). A preparação das nanoformulações está presente na patente depositada recentemente (**BR1020200021796**). Resumidamente, C-dots e OEs são solubilizados com água destilada e, em seguida, essas soluções passam por um processo de sonicação e agitação magnética por 4 horas. As amostras purificadas são armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente.

Figura 5. Nanoformulações desenvolvidas: C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu.



3.4 Caracterizações

3.4.1 Espectroscopia de fluorescência

As medições de fluorescência foram realizadas utilizando o espectrofluorímetro – Fluorolog[®] (HORIBA *Scientific*). Os espectros de fluorescência foram adquiridos de soluções aquosas das nanoformulações (C-dots@OEC e C-dots@Cu) e das nanopartículas, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. As amostras foram excitadas a 380 nm e o espectro de emissão na faixa de 300 a 700 nm foi medido. A largura da fenda foi fixada em 5 nm para excitação e emissão. Os resultados obtidos foram analisados no *software* Origin[®] 2019, sendo feitos gráficos de linhas da intensidade versus o comprimento de onda.

3.4.2 FTIR

Para a determinação de características estruturais das nanoformulações, as análises qualitativas foram realizadas utilizando o equipamento de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) – Varian[®] 640 (USA). Os espectros de IV foram registrados de pastilhas de KBr, na região espectral de 4000-400 cm^{-1} . Os resultados obtidos foram analisados no *software* Origin[®] 2019, sendo feitos gráficos de linhas da transmitância versus o número de onda.

3.4.3 MET

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas em um microscópio eletrônico JEOL JEM 2010, operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. As soluções aquosas dos materiais a serem analisados foram depositadas em uma tela de cobre revestida com carbono de 400 malhas (Ted Pella Inc- USA) e secas ao ar.

3.4.4 GC/MS

A análise qualitativa dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada em um cromatógrafo GC – 2010 acoplado a um detector GCMS – QP 2010 Plus com um injetor AOC – 5000, fazendo a análise no modo varredura (SCAN). Os compostos voláteis foram separados em uma coluna capilar Restek Rtx – 5MS (tamanho 30 m, ID 0,25 mm, filme 0,25 μm). A programação de temperatura da coluna iniciou a 40° C, aumentando até 100° C por uma rampa de 5° C.min⁻¹, permanecendo por 4 min, e então, aumentando até 250° C por 10° C.min⁻¹. Utilizou-se o gás hélio para arraste, com uma vazão constante de 1 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 230 e 250° C, respectivamente. As amostras foram diluídas em hexano puro (1 ppm) e o volume injetado foi de 1 μL . Os compostos foram analisados utilizando a biblioteca de compostos do próprio equipamento (NIST Library, N9N08).

3.5 Bioensaios

Os bioensaios descritos a seguir foram realizados em parceria com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e o Instituto Francês de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD). Foram testadas a inibição da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* e a mortalidade de larvas (J2) de *M. incognita* causadas pelas nanoformulações biopesticidas produzidas neste trabalho.

3.5.1 Ensaio da ação fungicida

❖ Coleta de esporos de *Hemileia vastatrix*

Os urediniósporos de *H. vastatrix* foram reproduzidos no Cenargen em folhas de cafeeiros Catuaí Amarelo (*C. arabica*) mantidos em casa de vegetação (**Figura 6**). Os urediniósporos de ferrugem das folhas de café foram removidos das folhas usando um bisturi de metal, colocados em um tubo eppendorf[®] de 1,5 mL e armazenados no escuro a 4° C. Após a coleta, os esporos com taxa de germinação superior a 80% foram armazenados a -80° C, os quais foram utilizados nos ensaios de germinação descritos a seguir.

❖ Ensaio de germinação

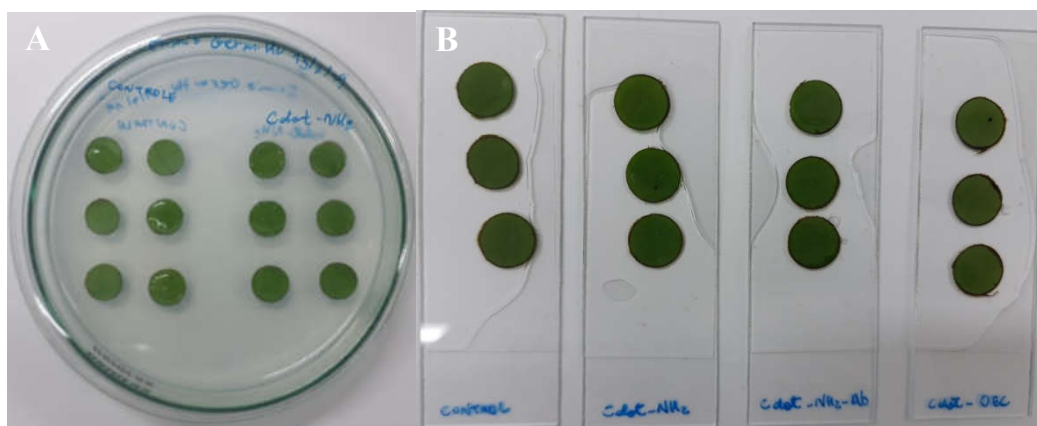
Para avaliar a inibição da germinação de urediniósporos, foram realizados testes em discos de folhas de café (1 cm²). Cada disco foi inoculado depositando uma gota de 100 urediniósporos de *H. vastatrix* em uma solução aquosa de 30 μL contendo uma das quatro nanoformulações preparadas. Os tratamentos estavam nas seguintes concentrações: C-dots@OEC, C-dots@OECr e C-dots@OELD a 3 mL.L⁻¹ cada, e C-dots@Cu a 70 mg.L⁻¹.

Discos inoculados com urediniósporos em água destilada foram utilizados como controle negativo de inibição da germinação. Foi utilizada uma solução de fungicida comercial (Recop[®]) a 0,1% como controle positivo de inibição da germinação. Soluções de C-dots (50 mg.L⁻¹), nitrato de cobre (70 mg.L⁻¹) e OEs (3 mL.L⁻¹) foram utilizadas como controles das formulações preparadas. As placas de Petri (**Figura 7**) preenchidas com ágar-água (2%) foram utilizadas para acondicionar os discos das folhas (lado abaxial para cima) e mantidas a 26° C no escuro.

Figura 6. Material biológico. **A.** Plantas de cafeeiro variedade Catuaí de 6 meses usadas neste trabalho. **B.** (face adaxial) e **C.** (face abaxial) 14 dias após a inoculação de uma folha do cafeeiro.



Figura 7. Testes de germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix*. **A.** Placa de Petri contendo os discos de folhas de café inoculados. Cada tratamento foi avaliado em triplicata após 24 horas. **B.** Lâminas de microscópio com os discos das folhas para as análises de germinação.



Após 24 h, os discos das folhas foram imersos brevemente em uma solução a 0,1% de *Fluorescent Brightener* (Sigma-Aldrich) para marcar as estruturas fúngicas e montados entre lamina e lamínulas (**Figura 7**). A germinação dos esporos foi avaliada por observação

sob luz ultravioleta na lente objetiva 10x, utilizando um microscópio de fluorescência Zeiss AxioPhot (Alemanha) equipado com um filtro DAPI. A taxa relativa de germinação de esporos foi calculada com base no número de esporos germinados em relação ao número total de esporos nos discos de cada folha. Cada tratamento foi testado com três discos foliares e o experimento foi repetido três vezes.

3.5.2 Ensaio da ação nematicida

❖ Extração de ovos de nematoide

Juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, raça 3, foram isolados de plantas de tomateiro inoculados com ovos de *M. incognita* há 90 dias e mantidas em casa de vegetação na Embrapa. Os ovos foram extraídos por meio da trituração das raízes em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, e incubados em câmara de eclosão contendo água mineral, a 28° C, conforme a técnica de Hussey e Barker (1973) [36]. Após 48 h, os J2 eclodidos foram contabilizados em uma lâmina de contagem (câmara de Peters) contendo 1 mL da suspensão, utilizando o microscópio ótico Zeiss Axiolab (Alemanha).

❖ Ensaio de mortalidade J2

Juvenis de segundo estágio foram coletados e colocados em placas de 24 poços KASVI[®]. Em média, 100 nematoides por 1 mL foram colocados em cada poço da placa (**Figura 8**). Os tratamentos foram conduzidos em testes aquosos para avaliar a eficácia das nanoformulações, os quais estavam nas seguintes concentrações: C-dots@OEC, C-dots@OECr e C-dots@OELD a 3 mL.L⁻¹ cada, e C-dots@Cu a 70 mg. L⁻¹. Soluções de C-dots (50 mg.L⁻¹), nitrato de cobre (70 mg.L⁻¹) e OEs (3 mL.L⁻¹) foram utilizadas como controles das formulações preparadas. Foi utilizada água destilada como controle negativo e uma solução de abamectina (1 mg.mL⁻¹) como controle positivo. O volume final por poço foi de 1,5 mL, sendo que cada tratamento continha três repetições (distribuído por coluna). As placas de 24 poços foram acondicionadas em uma estufa a 28° C, no escuro.

Após 24 h, a quantidade de J2 vivos e mortos foram avaliadas por observação sob luz branca na lente objetiva 10x, utilizando um microscópio ótico Zeiss Axiolab (Alemanha). Para confirmar a morte dos nematoides devido a algum dos tratamentos, foi utilizada uma solução de 20 µl de hidróxido de sódio 1 M (NaOH), observando se os mesmos permaneciam imóveis e esticados, assim, confirmando sua morte. Algumas fotos dos nematoides vivos e mortos foram feitas utilizando o microscópio de fluorescência Zeiss

Axiophot (Alemanha) sob luz branca na lente objetiva 10x. Cada contagem foi realizada três vezes.

Figura 8. Ensaio de mortalidade de larvas J2 de *Meloidogyne incognita* em placas de 24 poços.



3.6 Análise estatística

Os dados obtidos do ensaio de inibição da germinação dos urediniosporos foram corrigidos. A inibição ajustada foi calculada usando a fórmula de Abbott [55], em que a inibição é calculada como uma porcentagem e ajustada à inibição no controle usando a seguinte equação:

$$\text{inibição ajustada (\%)} = 1 - \left[\frac{(n \text{ esporos tratamento})}{(n \text{ esporos controle})} \right] \times 100$$

Os dados do ensaio de mortalidade de J2 foram corrigidos. A mortalidade ajustada foi calculada usando a fórmula de Schneider-Orelli [56], em que a mortalidade é calculada como uma porcentagem e ajustada à mortalidade no controle usando a seguinte equação:

$$\text{mortalidade ajustada (\%)} = 100 \times \left[\frac{(\% \text{ mortalidade tratamento} - \text{mortalidade controle})}{(100 - \text{mortalidade controle})} \right]$$

Os dados foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para indicar o tipo de distribuição dos dados. Por se tratarem de dados com distribuição não normal (livre), aplicou-se uma estatística não paramétrica, teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes. Ambos os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* SPSS (IBM® *SPSS Statistics*, versão 20.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações

As nanopartículas C-dots possuem características físicas e químicas próprias de acordo com a rota sintética adotada [49]. Devido ao acoplamento das moléculas bioativas na superfície dos C-dots, algumas de suas propriedades e características podem ser modificadas. Sendo assim, tanto as nanopartículas quanto os bioativos e os nanoformulados precisam ser caracterizados.

A fluorescência é uma das propriedades mais interessantes dos C-dots, sendo estes nanomateriais altamente fotoestáveis. A fotoluminescência caracteriza-se por uma absorção ou emissão dependente do tamanho da nanopartícula e do comprimento de onda da excitação. Tais fenômenos podem ser explicados pelo confinamento quântico, dependência de tamanho, defeitos de superfície, estados de superfície, grau de oxidação, entre outros [49, 57].

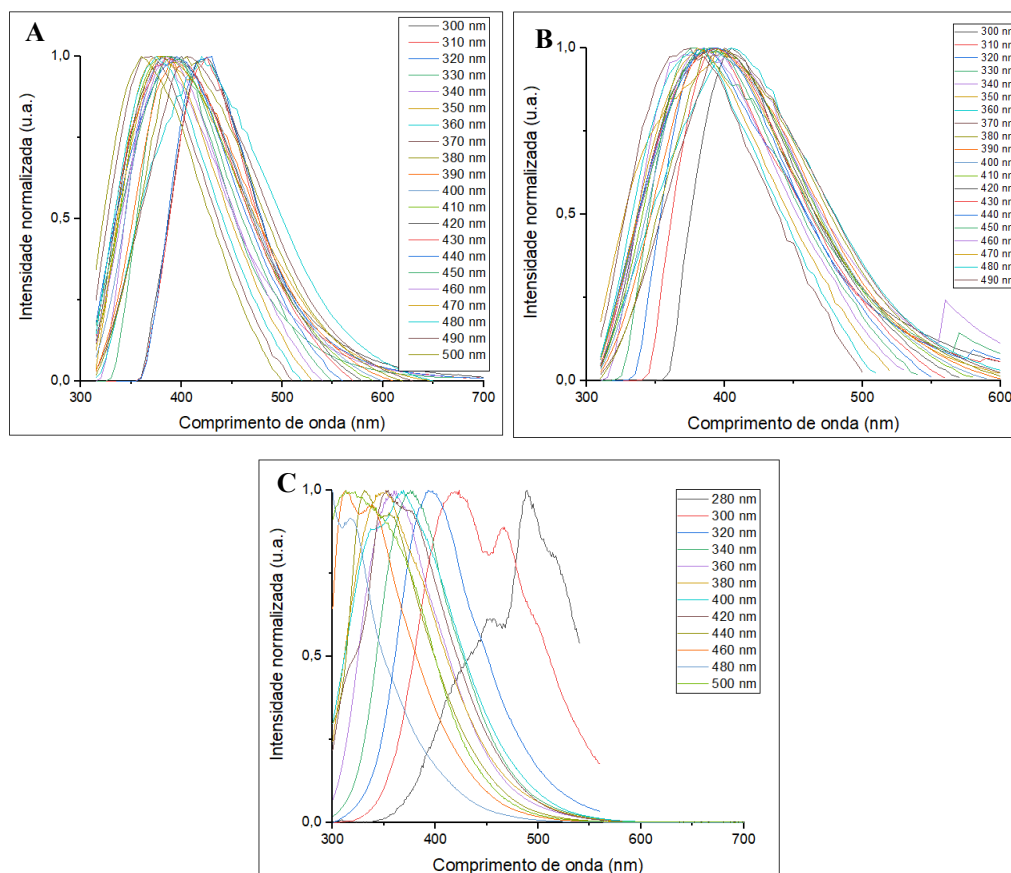
Os espectros de fluorescência adquiridos das amostras são apresentados na **Figura 9**, onde se observa que os máximos de emissão são dependentes do λ_{ex} 380 nm. São notadas que as características óticas das amostras são diferentes umas das outras. Para o **espectro A**, C-dots possui uma faixa de emissão mais intensa entre 360 a 430 nm. Peng e colaboradores (2017) discutem que o comportamento espectral da banda de emissão de 350-550 nm é atribuído às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ dos grupos funcionais na superfície da nanopartícula [58].

No **espectro B**, a nanoformulação C-dots@Cu possui faixa de emissão mais curta do que a da nanopartícula apenas, compreendendo-se entre 360-410 nm. Xu e colaboradores (2016) mostraram que a síntese de C-dots dopados com cobre produzia como característica ótica uma emissão mais forte a 440 nm, quando excitados a 350 nm (λ_{ex}). Esses autores também observaram que as emissões eram independentes da excitação, atribuindo esse fato à estrutura superficial homogênea e à monodispersividade dos CDs-Cu sintetizados [59].

Com o intuito de analisar como as moléculas bioativas provenientes dos OEs poderiam modificar a característica ótica das nanoformulações, fez-se uma avaliação inicial com a nanoformulação de OEC. No **espectro C**, a nanoformulação C-dots@OEC mostrou comportamento espectral diferente dos espectros de C-dots e C-dots@Cu, apresentando uma

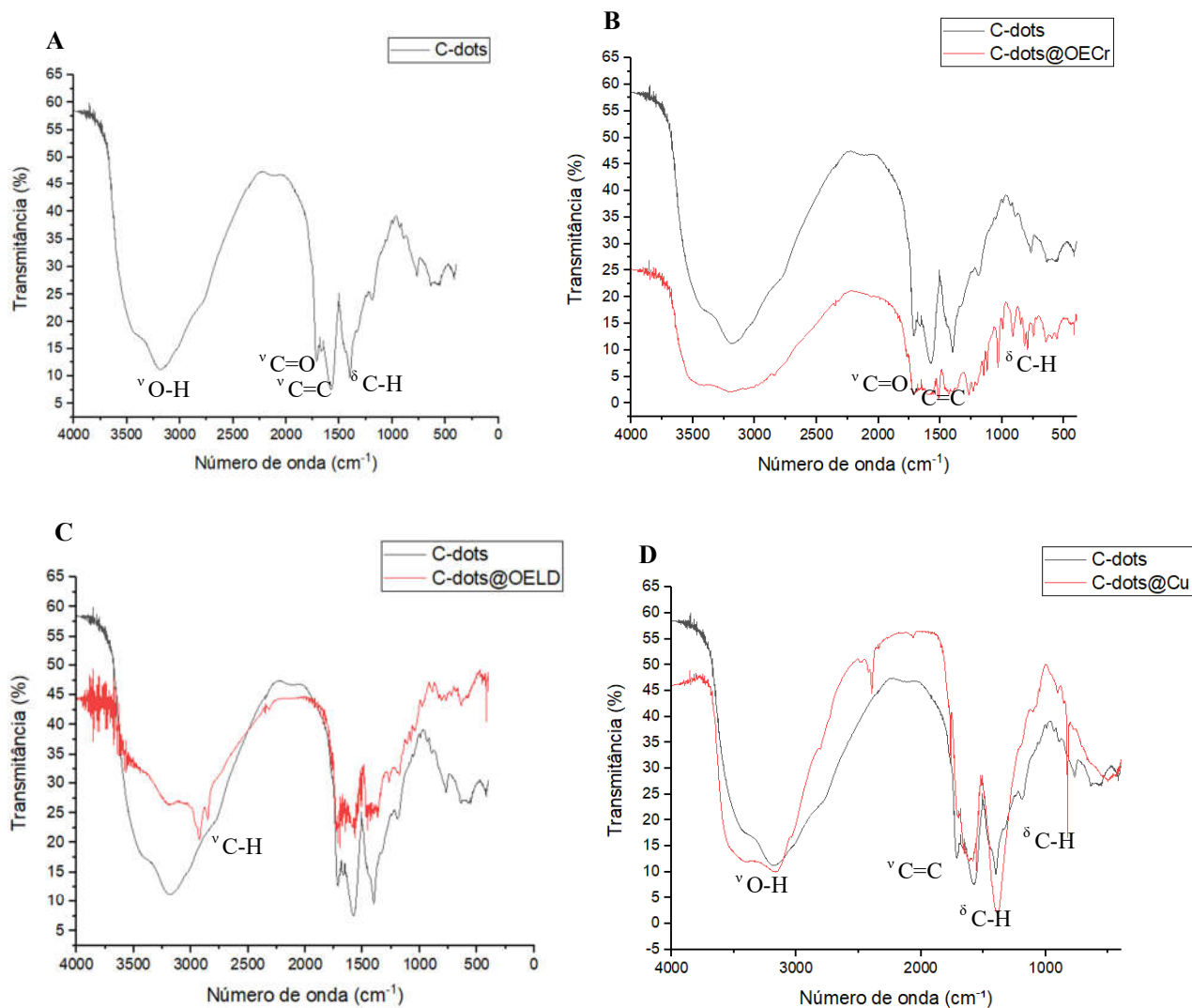
faixa de emissão mais intensa entre 310 a 490 nm e, em alguns comprimentos de onda de emissão mostrando até dois picos de distinguível intensidade. Esse tipo de espectro estaria de acordo com o previsto de que diferentes grupos funcionais presentes na superfície do C-dots da nanoformulação produziram um comportamento incomum [58].

Figura 9. Espectros de fluorescência obtidos do espectrofluorímetro. **A.** Espectro de emissão de C-dots. **B.** Espectro de emissão de C-dots@Cu. **C.** Espectro de emissão de C-dots@OEC.



Os espectros de infravermelho (IV) obtidos das amostras analisadas são apresentados na **Figura 10**. No **espectro A**, nota-se bandas de absorção intensas em 3230 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações O-H. A banda de estiramento C=O aparece por volta de 1720 cm^{-1} e uma banda de estiramento C=C aparece em 1570 cm^{-1} . O pico de dobramento CH_3 possui absorção de aproximadamente 1396 cm^{-1} . No **espectro B**, foi identificada uma banda de estiramento C=O em 1710 cm^{-1} , uma banda de estiramento C=C em 1515 cm^{-1} e um pico de dobramento CH_3 em 1267 cm^{-1} . Já no **espectro C**, a absorção da nanoformulação C-dots@OELD apresentou uma banda de absorção em 2930 cm^{-1} do estiramento das ligações C-H no carbono sp^3 .

Figura 10. Espectros de infravermelho das nanoformulações produzidas. Linhas em preto referem-se às nanopartículas de C-dots; linhas em vermelho são as nanoformulações.



No **espectro D**, há vários pontos de absorção em comum com o espectro A. A nanoformulação C-dots@Cu apresenta bandas de estiramento O-H em 3150 cm⁻¹ e C=C em 1580 cm⁻¹, além de bandas de dobramento C-H em 1380 cm⁻¹ e =C-H em 825 cm⁻¹. Xu e colaboradores (2016) mostraram que os CDs-Cu sintetizados apresentavam como característica proeminente o estiramento das ligações O-H. Os resultados das análises de XPS realizadas por esses autores mostraram que o carbono oxidado dos CDs-Cu eram provenientes da forma de carbono conectado aos grupos OH, e que a presença do grupo OH polar na superfície das nanopartículas tornava esses C-dots de excelente solubilidade em água [59].

A determinação dos compostos com propriedades biológicas extraídos de plantas é de suma importância, uma vez que essas moléculas bioativas podem ser utilizadas na síntese de novos medicamentos, ou mesmo, na produção de novos biopesticidas no controle de pragas agrícolas [40]. As composições químicas dos OEs utilizados na construção das nanoformulações com C-dots são apresentadas na **Tabela 1** e na **Figura 11**.

Na composição volátil do óleo essencial de citronela (OEC), três compostos químicos foram considerados majoritários, destacando-se o β -citronelal (37,36%), β -citronelol (12,61%) e geraniol (18,79%), além de outros compostos com área superior a 1%. Esses resultados estão condizentes aos obtidos por Scherer e colaboradores (2009), que encontraram valores de 45, 14,49 e 20,71% para β -citronelal, β -citronelol e geraniol, respectivamente [61].

No óleo essencial de cravo (OECr), os compostos majoritários foram o eugenol (81,85%) e β -cariofileno (11,04%). Os resultados obtidos por Scherer e colaboradores (2009) para esse óleo essencial se mostram similares aos encontrados no presente trabalho, uma vez que os pesquisadores analisaram como principais compostos do OEC o eugenol 83,75 % e β -cariofileno 10,98 % [61].

Para o óleo essencial de laranja doce (OELD), apenas um composto químico se mostrou mais abundante na sua composição, sendo limoneno a 85,51% da área total. Martins e colaboradores (2017) mostraram que para esse mesmo óleo essencial, encontrou-se um valor de 83% de D-limoneno na sua composição [62].

A diferença da composição química existente entre os OEs tem relação direta nas suas propriedades funcionais e em que tipos de aplicações estes podem ser empregados. OEC (extraído de *Cymbopogon winterianus*) é relatado na literatura como potencial inseticida, fungicida e repelente de mosquitos vetores da dengue (*Aedes aegypti*) [38, 39, 40, 61]. OECr (extraído de *Eugenia caryophyllus*) é conhecido por aplicações anestésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, entre outras [39,40,61]. Já o OELD (extraído de *Citrus aurantium*) como potencial inseticida e antimicrobiano [38, 39, 61].

Os compostos bioativos presentes nos OEs caracterizados são os ingredientes ativos (AI) de interesse a serem acoplados na superfície das nanopartículas C-dots. Como visto na **Tabela 1**, os principais compostos de interesse são β -citronelal, β -citronelol, geraniol, eugenol, β -cariofileno e limoneno. Analisando a **Figura 11**, a estrutura bidimensional e a

fórmula molecular dos compostos citados estão de acordo com os resultados preliminares obtidos da análise de FTIR das nanoformulações produzidas, indicando, assim, que esses compostos devem estar presentes na superfície dos C-dots [63].

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de citronela (OEC), cravo (OECr) e laranja doce (OELD), determinada por GC/MS.

Composto	OEC (%)	OECr (%)	OELD (%)
Limoneno	2,54	-	85,51
α -Terpinoleno	0,42	-	-
Linalol	0,42	-	-
Iso-pulegol	0,59	-	-
β -citronelal	37,36	-	-
β -citronelol	12,61	-	-
Geraniol	18,79	-	-
Acetato de citronelila	3,69	-	-
Acetato de geranila	4,03	-	-
Germacreno D	1,95	-	-
α -muroleno	0,41	-	-
Germacreno A	0,27	-	-
γ -cadineno	0,50	-	-
Δ -cadineno	2,06	-	-
Germacreno D-4-ol	0,74	-	-
10-epi- γ -eudesmol	0,26	-	-
α -cadinol	1,83	-	-
Elemol	2,81	-	-
Eugenol	-	81,85	-
β -cariofileno	-	11,04	-
α -humuleno	-	1,72	-
β -mirceno	-	-	0,91

A imagem de MET adquirida de C-dots produzidos (**Figura 12**) mostram nanopartículas bem dispersas com morfologias esféricas. Para determinar o tamanho destas partículas foi feito um histograma da distribuição do tamanho das nanopartículas e sua conseguinte normalização por log normal. Observa-se, que as nanopartículas da amostra estudada possuem diâmetro médio de 5,3 nm (d_0). Deste modo, os resultados obtidos mostram que a síntese hidrotermal de C-dots resultou em nanopartículas uniformes com distribuição de tamanhos semelhantes a cinco nanômetros.

Figura 11. Estruturas bidimensionais da composição química dos óleos essenciais com suas respectivas fórmulas moleculares. Fonte: PubChem®.

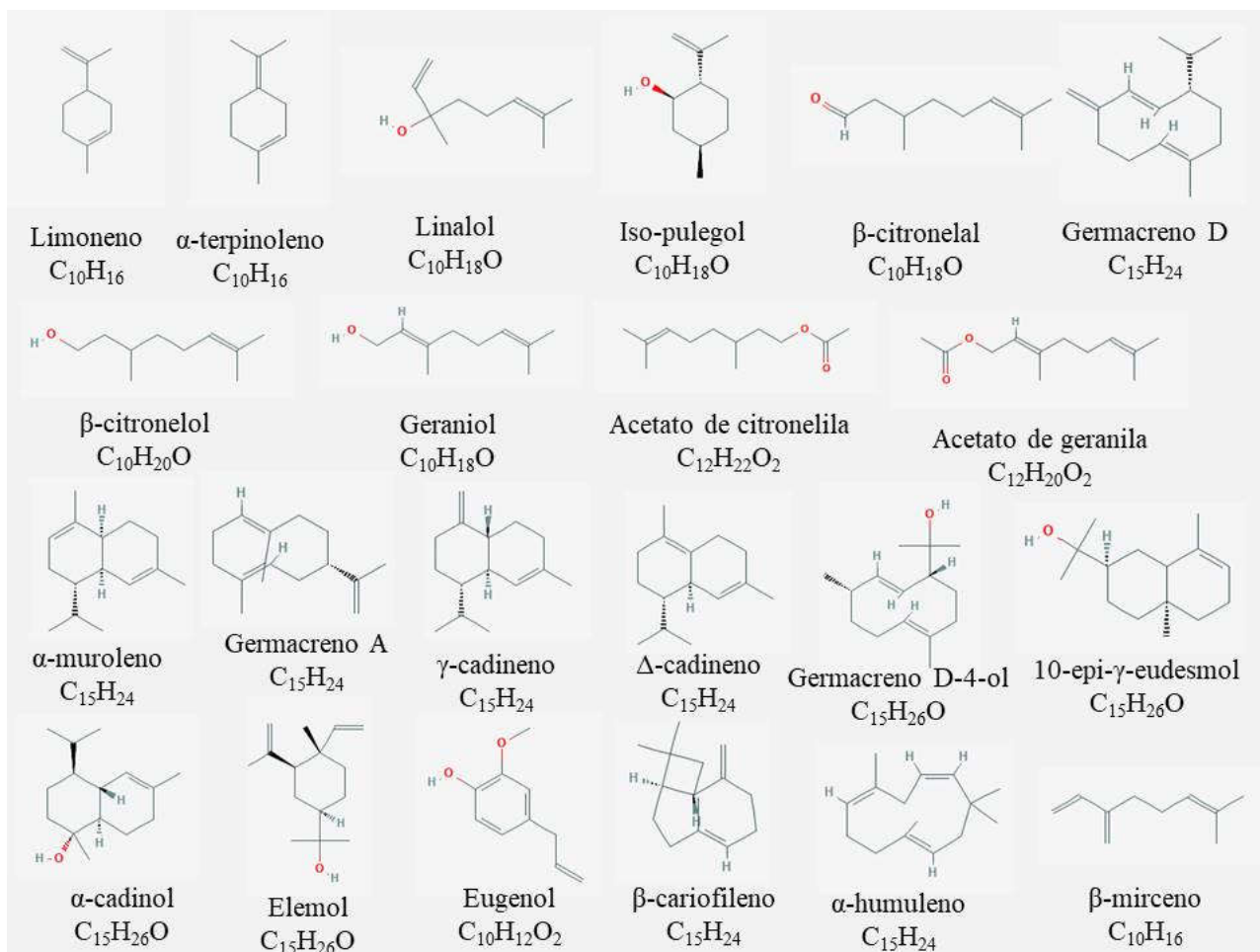
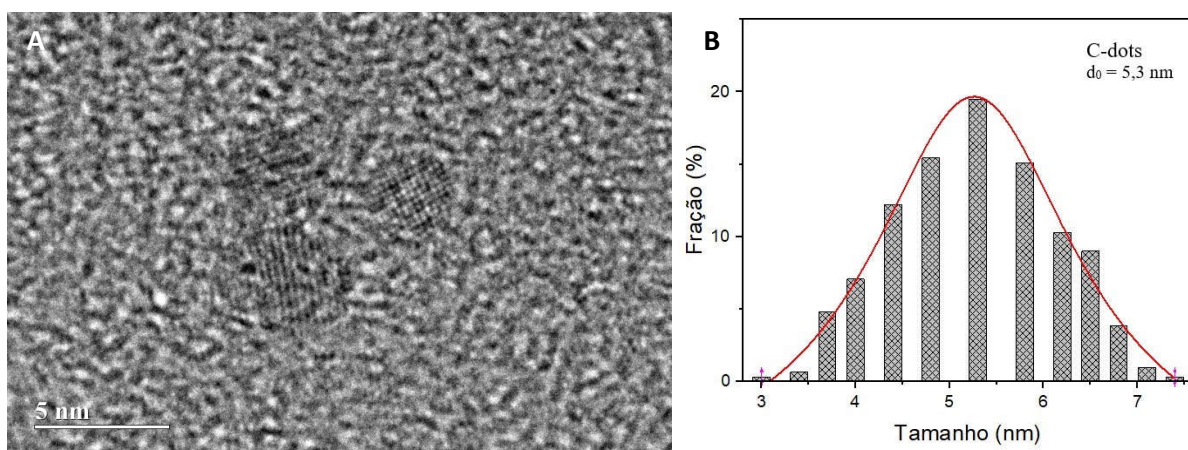


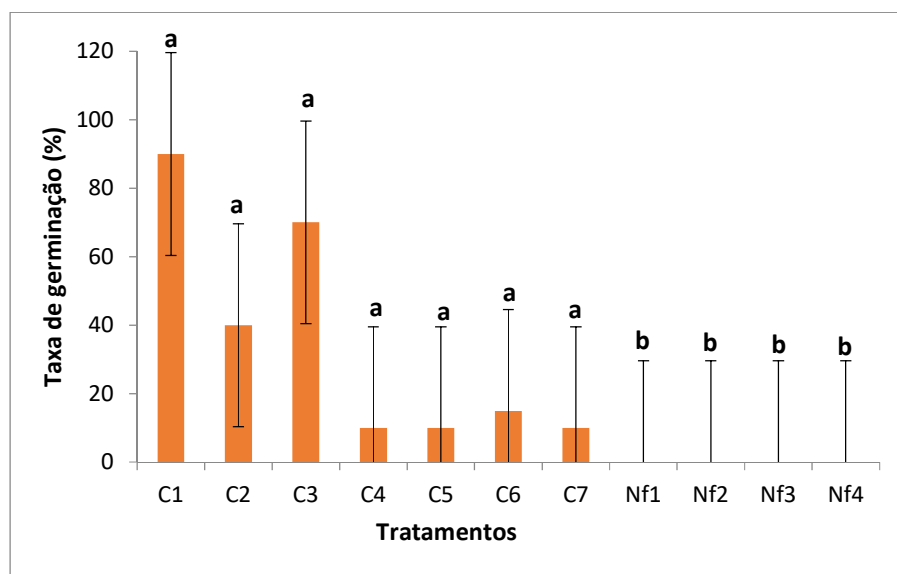
Figura 12. Resultados obtidos por MET. **A.** imagem de MET dos C-dots. **B.** histograma de distribuição da nanopartícula.



4.2 Bioensaios

Com as nanoformulações produzidas, uma das etapas mais importantes é a avaliação das possíveis aplicações destes produtos tecnológicos. Para avaliar se há atividade antifúngica, as nanoformulações foram utilizadas no controle da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* em discos de folha de café (**Figura 13 e 14**). É mostrado que há maior taxa de inibição da germinação dos esporos quando se utilizam as nanoformulações C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu, em comparação aos controles negativo, positivo (água destilada e Recop[®], respectivamente), aos OEs e nitrato de cobre, após 24 horas.

Figura 13. Avaliação da taxa de germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* com diferentes tratamentos após 24 horas. Controles: C1. água destilada. C2. Recop[®]. C3. C-dots. C4. OEC. C5. OECr. C6. OELD. C7. nitrato de cobre. Nanoformulações: Nf1. C-dots@OEC. Nf2. C-dots@OECr. Nf3. C-dots@OELD. Nf4. C-dots@Cu. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão da média.



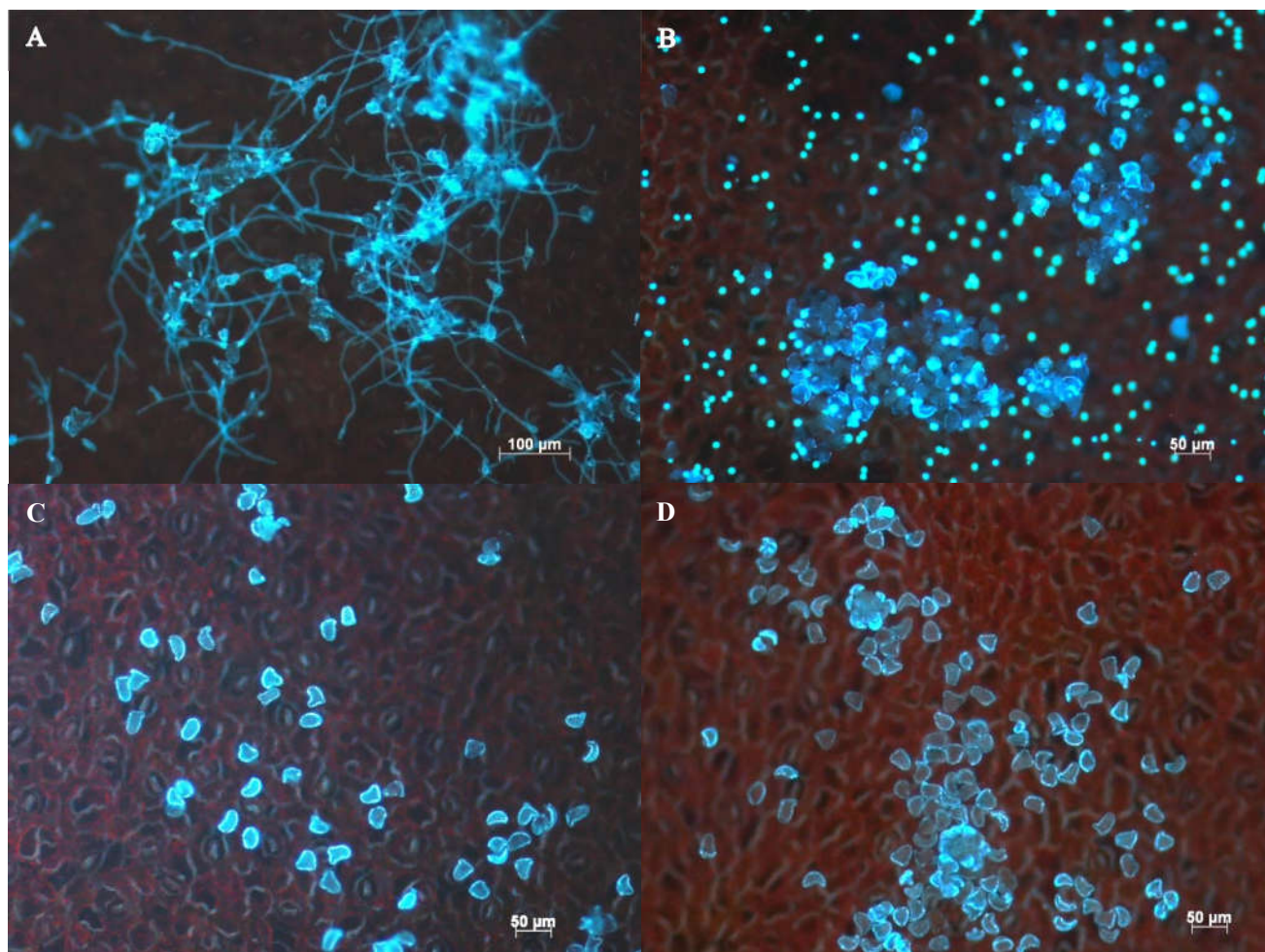
De acordo com a **Tabela 2**, o teste de Kruskal-Wallis mostrou que há uma diferença estatisticamente significativa nas taxas de inibição da germinação dos esporos entre os diferentes tratamentos aplicados ($p < 0,05$). Além disso, o teste mostrou que há mais diferença estatisticamente significativa nas taxas de inibição associadas às nanoformulações C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu ($p < 0,05$) quando comparadas aos controles (**Figura 13**). Os resultados indicam que o uso das nanoformulações inibe o desenvolvimento do fungo em discos foliares de café em relação aos outros compostos testados, podendo chegar a 100% de inibição da germinação do fungo.

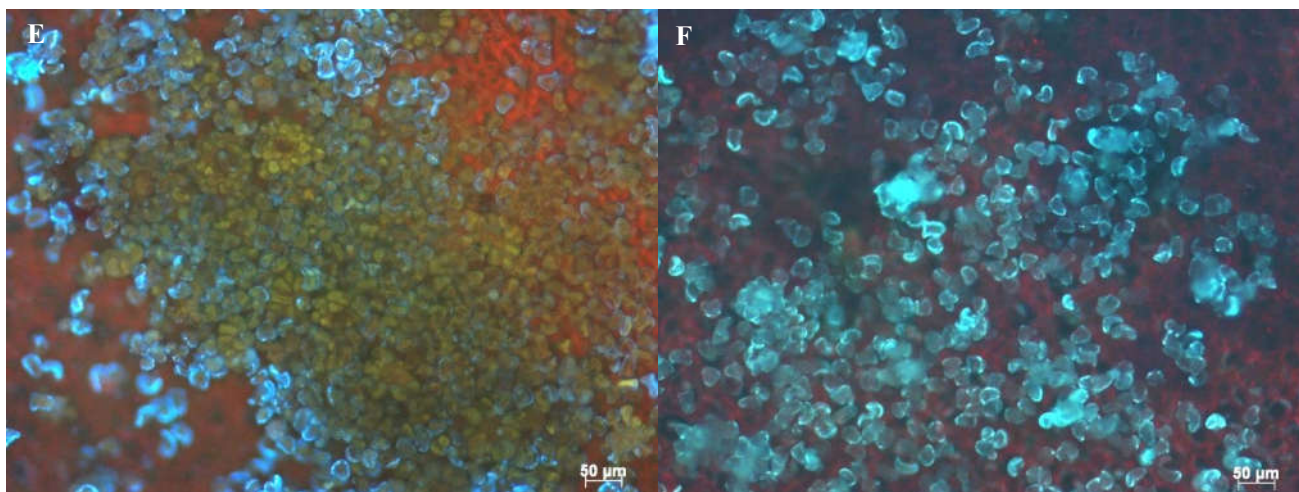
Tabela 2. Estatística aplicada aos bioensaios realizados com as nanoformulações.

Bioensaio	N	χ^2	DF	p-valor
Germinação urediniósporos	33	30,330	10	0,001
Mortalidade J2	33	30,198	10	0,001

N = número total; χ^2 = teste Qui-quadrado; DF = graus de liberdade.

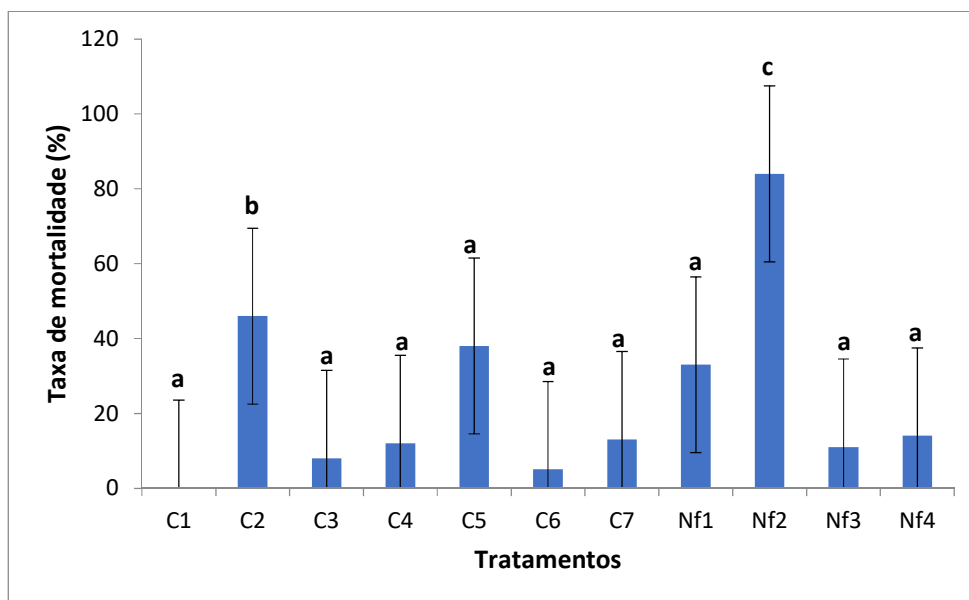
Figura 14. Avaliação da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* com distintos tratamentos, após 24 horas. **A.** controle negativo (água destilada). **B.** controle positivo (Recop[®]). **C.** C-dots@OEC. **D.** C-dots@OECr. **E.** C-dots@OELD. **F.** C-dots@Cu.





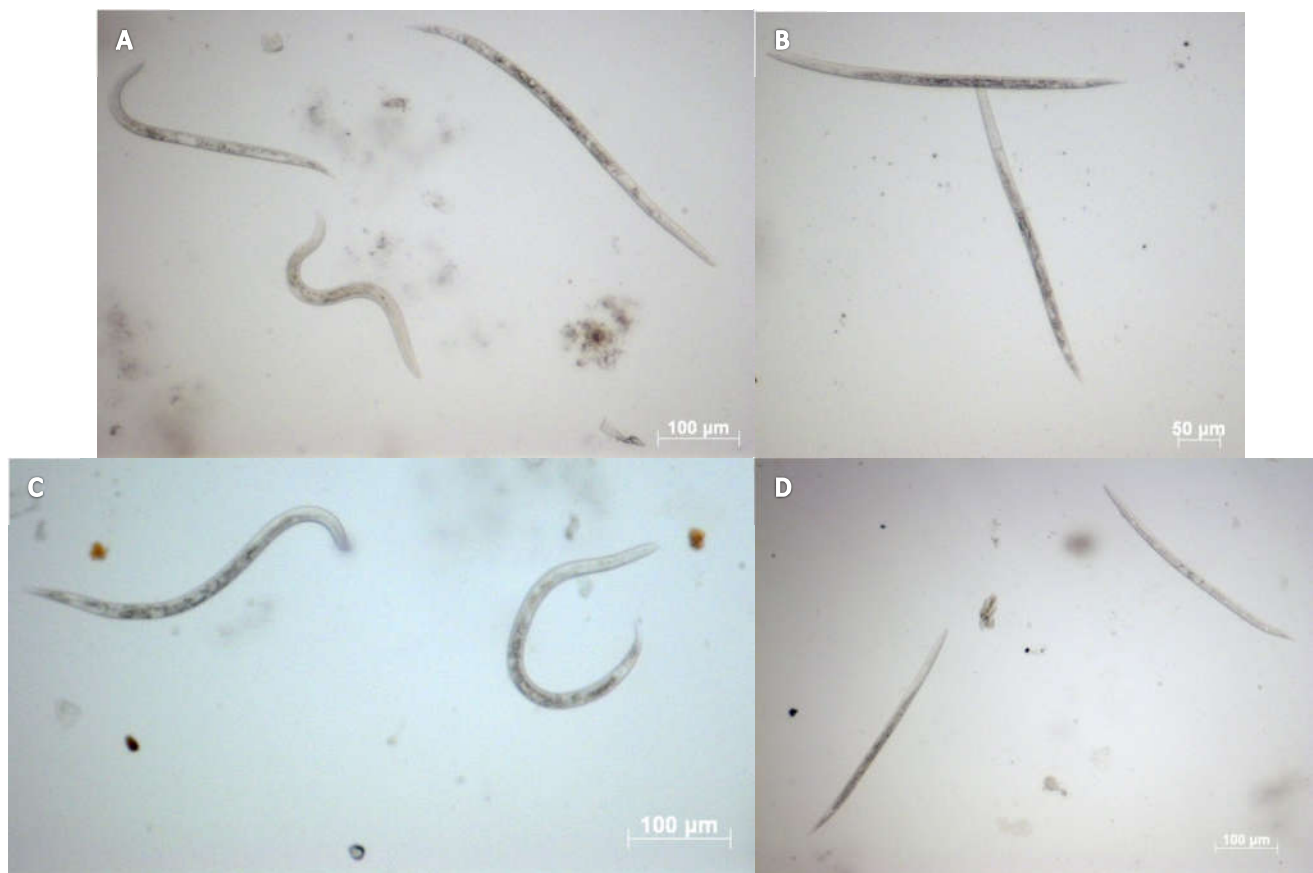
A atividade nematicida das nanoformulações em J2 de *M. incognita* também foi testada (**Figura 15 e 16**). Os resultados mostraram que há maior taxa de mortalidade de nematoides quando se utiliza a nanoformulação C-dots@OECr (84%), em comparação aos controles negativo e positivo (água destilada e abamectina, respectivamente) e aos demais tratamentos, após 24 horas.

Figura 15. Avaliação da taxa de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* com diferentes tratamentos após 24 horas. Controles: C1. água destilada. C2. abamectina. C3. C-dots. C4. OEC. C5. OECr. C6. OELD. C7. nitrato de cobre. Nanoformulações: Nf1. C-dots@OEC. Nf2. C-dots@OECr. Nf3. C-dots@OELD. Nf4. C-dots@Cu. As médias seguidas pela letra **a** não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As médias seguidas pelas letras **b**, **c** diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As barras de erro representam o desvio padrão da média.



De acordo com a **Tabela 2**, o teste de Kruskal-Wallis mostrou que há uma diferença estatisticamente significativa nas taxas de mortalidade dos J2 entre os diferentes tratamentos aplicados ($p < 0,05$). Além disso, o teste mostrou que há mais diferença estatisticamente significativa nas taxas de mortalidade associadas à nanoformulação C-dots@OECr e ao controle OECr ($p < 0,05$) quando comparadas aos outros controles (**Figura 15**). Logo, sugere-se que a nanoformulação C-dots@OECr tem caráter nematicida quando utilizada no controle de J2 de *M. incognita*.

Figura 16. Avaliação da mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* com diferentes tratamentos, após 24 horas. **A.** controle negativo (água destilada). **B.** controle positivo (abamectina). **C.** C-dots. **D.** C-dots@OECr.



5 CONCLUSÃO

A criação de tecnologias que possam controlar pragas agrícolas e garantir a segurança futura dos alimentos e do ecossistema é o almejado desde a instituição da Revolução Verde. Assim, foram desenvolvidas no presente trabalho quatro nanoformulações baseadas em C-dots e óleos essenciais de citronela, cravo e laranja doce e C-dots e cobre (C-dots@OEC, C-dots@OECr, C-dots@OELD e C-dots@Cu), as quais foram produzidas para serem aplicadas no controle de pragas agrícolas de interesse econômico. As nanopartículas empregadas nessas formulações foram C-dots morfologicamente esféricos com tamanho de 5,3 nm. Priorizou-se uma síntese simples destes nanomateriais com o uso de uma fonte convencional de carbono.

C-dots foram utilizados nas construções das nanoformulações com o objetivo de: melhorar a solubilidade dos compostos bioativos presentes na constituição dos OEs utilizados, aumentar a estabilidade aquosa, diminuir o custo da utilização, diminuir a concentração de OEs utilizados, torná-los eco amigáveis, evitar oxidação e fotodegradação, entre outros. Além disso, de acordo com os grupos funcionais baseados em oxigênio/nitrogênio (–COOH, –NH₂ e –OH) presentes na superfície das nanopartículas, buscou-se realizar o acoplamento dos compostos bioativos provenientes dos OEs.

As nanoformulações apresentaram características semelhantes com pequenas variações, como demonstrado nos experimentos de espectroscopia de fluorescência e de infravermelho. Entretanto, como se tratou de caracterizações iniciais destes preparados, novos experimentos deverão ser realizados para melhorar a identificação das características próprias de cada nanoformulado. De acordo com a caracterização dos OEs, foi possível identificar que os compostos bioativos majoritários são β -citronelal, β -citronelol, geraniol, eugenol, β -cariofileno e limoneno.

As nanoformulações produzidas foram testadas em bioensaios com pragas de interesse na agricultura. Na avaliação da atividade fungicida, houve maior taxa de inibição da germinação de urediniósporos de *H. vastatrix* quando se utilizaram as quatro nanoformulações ($p < 0,05$). Na avaliação da atividade nematicida, houve maior taxa de mortalidade de larvas J2 de *M. incognita* quando se utilizou a nanoformulação C-dots@OECr (84%).

O presente trabalho resultou na produção de uma patente, a qual foi depositada, recentemente, pelo nosso grupo. O comprovante de depósito encontra-se em anexo, com o número do processo **BR1020200021796**.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Acredita-se que as nanoformulações desempenham um papel fundamental na abordagem de controle de pragas e doenças de plantas, um dos maiores desafios enfrentados pela agricultura atual. Os resultados reportados nessa dissertação demonstram o potencial de uso das nanoformulações como novos biopesticidas.

Neste presente trabalho, foram reportados resultados iniciais das caracterizações das nanopartículas, nanoformulações e dos óleos essenciais. Uma vez que foram confirmadas aplicações destas, pretende-se refazer as caracterizações aqui apresentadas, além de serem realizadas as seguintes técnicas: espectrofotometria ultravioleta-visível e infravermelho próximo (UV-Vis-NIR), espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de transmissão (MET), comportamento coloidal (espalhamento dinâmico de luz (DLS), Zeta, pH, força iônica), entre outras mais de interesse.

Para corroborar os dados obtidos dos bioensaios, novos experimentos devem ser realizados com as nanoformulações produzidas em plantas inteiras, testar os nanoformulados mimetizando culturas de café e tomate no campo para controlar *H. vastatrix* e *M. incognita*. Ademais, outras aplicações em pragas agrícolas também serão testadas para essas nanoformulações.

Com o depósito da patente referente ao trabalho produzido, pretende-se dar continuidade na obtenção de um produto tecnológico para ser aplicado na agricultura para controlar pragas de plantas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MARRIOTT, Emma. *The History of the World in Bite-Sized Chunks*. London: Michael O'Mara Limited, 192 p., 2012.
- [2] FAO. *Land use - Agriculture*. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL>>. Acesso em: 9 dez. 2019.
- [3] IBGE. *Censo Agropecuário 2017*. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html>. Acesso em: 9 dez. 2019.
- [4] CONAB. Acompanhamento da safra brasileira 2019/2020. *Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos safra 2019/20*, v. 7, n. 5, p. 1–112, fev. 2020.
- [5] BRODT, S.; SIX, J; FEENSTRA, G; INGELS, C; CAMPBELL, D. Sustainable Agriculture. *Nature Education Knowledge*, v. 3, n. 10, p. 1, 2011.
- [6] KITAMURA, Paulo Choji. Agricultura sustentável no Brasil: avanços e perspectivas. *Ciência e Ambiente*, v. 27, p. 7–27, 2003.
- [7] REGANOLD, John P; WACHTER, Jonathan M. Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature plants*, v. 2, n. February, p. 15221, 2016.
- [8] FAO. *Committee on agriculture - 15th Session*. 1999, Roma: [s.n.], p. 1, 1999.
- [9] HOWDEN, S.M; SOUSSANA, J.F; TUBIELLO, F.N; CHHETRI, N; DUNLOP, M; MEINKE, H. Adapting agriculture to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 50, p. 19691–19696, 2007.
- [10] PRADHAN, Saheli; MAILAPALLI, Damodhara Rao. Interaction of Engineered Nanoparticles with the Agri-environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 38, p. 8279–8294, 2017.
- [11] VISHWAKARMA, K; UPADHYAY, N; KUMAR, N; TRIPATHI, D; CHAUHAN, D; SHARMA, S; SAHI, S. Chapter 21 - Potential Applications and Avenues of Nanotechnology in Sustainable Agriculture. In: TRIPATHI, DURGESH KUMAR *et al.* (Org.). [S.l.]: Academic Press, p. 473–500, 2018.
- [12] AGRIOS, George. *Plant Pathology*. 5th. ed. San Diego, USA: Elsevier Academic Press, 2005.
- [13] FAO. *Revision of the international plant protection convention*. Roma: [s.n.], p. 1, 1997.
- [14] SAVARY, S; WILLOCQUET, L; PETHYBRIDGE, S; McROBERTS, N; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.
- [15] FISHER, M; HENK, D; BRIGGS, C; BROWNSTEIN, J; MADOFF, L; McCRAW, S; GURR, S. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.
- [16] GREGORY, Ian N; CUNNINGHAM, Niall A. ‘The judgement of God on an indolent and unself-reliant people’?: the impact of the Great Irish Famine on Ireland’s religious demography. *Journal of Historical Geography*, v. 51, p. 76–87, 2016.
- [17] PENDERGRAST, Mark. Coffee second only to oil? *Tea Coffee Trade Journal*, April: 38–41, 2009.
- [18] ICO. *Coffee Market Report - July 2019*. London, 2019. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0719-e.pdf>>.
- [19] TALHINHAS, P; BATISTA D; DINIZ, I; VIEIRA, A; SILVA, D.N; LOUREIRO, A; TAVARES, S; PEREIRA, A.P; AZINHEIRA, H.G; GUERRA-GUIMARÃES, L; VÁRZEA, V; SILVA, M.D.C. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and

- a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18: 1039-1051, 2017.
- [20] ZAMBOLIM, Laércio. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8, 2016.
- [21] ALFONSI, W.M.V; COLTRI, P.P; JÚNIOR, J.Z; PATRÍCIO, F.R.A; ALFONSI, E.L. Período de incubação da ferrugem do cafeeiro. *Summa phytopathol.*, Botucatu, v.45, n. 2, p. 134-140, Apr. 2019.
- [22] BETTENCOURT A.J; RODRIGUES C.J.J. Principles, practice of coffee breeding for resistance to rust, other diseases. In: Clarke RJ, Macrae R (eds) *Coffee*, vol 4, Agronomy. Elsevier, London, pp 199–234, 1988.
- [23] FRÁGUAS, R.M; COSTA, V.A; TERRA, W.C; AGUIAR, A.P; MARTINS, S.J; CAMPOS, V.P; OLIVEIRA, D.F. Toxicities of 4,5-Dihydroisoxazoles Against Root-Knot Nematodes and in Silico Studies of Their Modes of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 2, p. 523–529, 15 jan. 2020.
- [24] COLLANGE, B ; NAVARRETE, M ; PEYRE, G ; MATEILLE, T ; TCHAMITCHIAN, M. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection*, Elsevier, 30 (10), pp.1251-1262, 2011.
- [25] CUNHA, T.G; VISOTTO, L.E; LOPES, E.A; OLIVEIRA, C.M.G; GOD, P.I.V. Diagnostic methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.48, n. 2, e20170449, 2018.
- [26] JONES, J.T; HAEGEMAN, A; DANCHIN, E.G; GAUR, H.S; HELDER, J; JONES, M.G. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*, 14, 946–961, 2013.
- [27] FASKE, T; STARR, J. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Abamectin. *Journal of nematology*, v. 38, p. 240–244, 1 jul. 2006.
- [28] LI, B; REN, Y; ZHANG, D; XU, S; MU, W; LIU, F. Modifying the Formulation of Abamectin To Promote Its Efficacy on Southern Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) under Blending-of-Soil and Root-Irrigation Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 4, p. 799–805, 2018.
- [29] ABAD, P; GOUZY, J; AURY, J.M; CASTAGNONE-SERENO, P; DANCHIN, E.G.J; DELEURY, E; PERFUS-BARBEOCH, L; ANTHOUARD, V; ARTIGUENAVE, F; BLOK, V.C, *et al.* Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol*, 26: 909–915, 2008.
- [30] RAMADASS, M; THIAGARAJAN, P. Effective pesticide nano formulations and their bacterial degradation. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 263 022050, 2017.
- [31] FAO. *Pesticides Use Dataset*. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>. Acesso em: 22 dez. 2019.
- [32] DUHAN, J.S ; KUMAR, R ; KUMAR, N; KAUR, P; NEHRA, K; DUHAN, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, v. 15, p. 11–23, 2017.
- [33] LANGLEY, R.L; MORT, S.A. Human Exposures to Pesticides in the United States. *Journal of Agromedicine*, 17:3, 300-315, 2012.
- [34] GRIGORI, Pedro. Agrotóxico, veneno, defensivo? Entenda a disputa pelo nome desses produtos agrícolas. *Repórter Brasil*, 24 jan. 2019. , p. 1. Disponível em: <<https://reporterbrasil.org.br/2019/01/agrotoxico-veneno-defensivo-entenda-a-disputa-pelo-nome-desses-produtos-agricolas/>>. Acesso em: 22 dez. 2019.

- [35] SPORLEDER, Marc; LACEY, Lawrence A. Chapter 16 - *Biopesticides*. In: ALYOKHIN, ANDREI; VINCENT, CHARLES; GIORDANENGO, PHILIPPE B T - INSECT PESTS OF POTATO (Org.). San Diego: Academic Press, p. 463–497, 2013.
- [36] HUSSEY R.S; BARKER K.R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028, 1973.
- [37] ELOH, K; KPEGBA, K; SASANELLI, N; KOUMAGLO, H.K; CABONI, P. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. *International Journal of Pest Management*, p. 1-11, 2019.
- [38] BRUM, R.B.C.S; CASTRO, H.G; CARDON, C.H; PEREIRA, A.S; CARDOSO, D.P; SANTOS, G.R. Antifungal activity of essential oils on pathogenic fungi. *Magistra*, Cruz das Almas – BA, V. 26, n.3, p. 361–371, 2014.
- [39] OSORIO, P.R.A; LEO, E.U; VELOSO, R.A; MOURAO, D.S.C; SANTOS, G.R. Essential Oils for Alternative Teak Rust Control. *Floresta e Ambiente*, v. 25, n. 2, p. 1–9, 2018.
- [40] MOSSA, Abdel-Tawab H. Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J. Environ. Sci. Technol*, 9: 354-378, 2016.
- [41] COMTRADE. *Market of Essential Oils*. Disponível em: <<https://comtrade.un.org/>>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- [42] International Organization for Standards – ISO/TC 229: *Nanotechnologies*. ISO/TS 80004-1: Vocabulary — Part 1: Core terms, 2015. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en:term:2.3>>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- [43] PODDAR, K; VIJAYAN, J; RAY, S; ADAK, T. Chapter 10 - *Nanotechnology for Sustainable Agriculture*. In: SINGH, RAM LAKHAN; MONDAL, SUKANTA B T - Biotechnology for sustainable agriculture (Org.). [S.l.]: Woodhead Publishing. p. 281–303, 2018.
- [44] CALLISTER, W. D. Jr. *Materials Science and Engineering: an introduction*. 8th Edition, John Willey, New York, 2010.
- [45] CHAUDHRY, Q; SCOTTER, M; BLACKBURN, J; ROSS, B; BOXALL, A; CASTLE, L; AITKEN, R; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives & Contaminants: Part A*, [s.l.], v. 25, n. 3, p.241-258, mar. 2008.
- [46] AMETA, S.C.; AMETA, R. *Green chemistry: fundamentals and applications*. 1st edition, Apple Academic Press, New Jersey, 2014.
- [47] PINGALI, P. L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12302–12308, 2012.
- [48] TUERHONG, M; XU, Y; YIN, X. Review on Carbon Dots and Their Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 45, n. 1, p. 139–150, 2017.
- [49] CHOI, Y; CHOI, Y; KWON, O; KIM, B. Carbon Dots: Bottom-Up Syntheses, Properties, and Light-Harvesting Applications. *Chemistry - An Asian Journal*, v. 13, n. 6, p. 586–598, 2018.
- [50] TESA, Maria. Photoluminescence Spectroscopy of Carbon Dots. *Edinburgh Instruments*, v.1, n.1, p. 1-3, 2019.
- [51] LI, Y; XU, X; WU, Y; ZHUANG, J; ZHANG, X; ZHANG, H; LEI, B; HU, C; LIU, Y. A review on the effects of carbon dots in plant systems. *Materials Chemistry Frontiers*, 12 p, 2020.

- [52] GAHUKAR, Ruparao T; KUMAR, Ratul. Plant - derived nanopesticides for agricultural pest control : challenges and prospects. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, v. 2, p. 1–9, 2020.
- [53] RAJWADE, Jyutika M.; CHIKTE, R. G.; PAKNIKAR, K. M. Nanomaterials: new weapons in a crusade against phytopathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 17, 2020.
- [54] HAYLES, J; JOHNSON, L; WORTHLEY, C; LOSIC, D. 5 - *Nanopesticides: a review of current research and perspectives*. In: GRUMEZESCU, ALEXANDRU MIHAI B T - NEW PESTICIDES AND SOIL SENSORS (Org.). [S.l.]: Academic Press, p. 193–225, 2017.
- [55] FLEMING, R.; RETNAKARAN, A. Evaluating Single Treatment Data Using Abbott's Formula with Reference to Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 78(6), 1985.
- [56] SCHNEIDER-ORELLI O. *Entomologisches Praktikum*, 2nd ed. H.R. Sauerlander, Aarau, Switzerland, 1947.
- [57] SHARMA, V.; TIWARI, P.; MOBIN, S. M. Sustainable carbon-dots: recent advances in green carbon dots for sensing and bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 5, n. 45, p. 8904–8924, 2017.
- [58] PENG, Z; HAN, X; LI, S; AL-YOUBI, A.O; BASHAMMAAKH, A.S; EL-SHAHAWI, M.S; LEBLANC, R.M. Carbon dots: Biomacromolecule interaction, bioimaging and nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 343, p. 256–277, 2017.
- [59] XU, Q; WEI, J; WANG, J; LIU, Y; LI, N; CHEN, Y; GAO, C; ZHANG, W; SREEPRASED, T.S. Facile synthesis of copper doped carbon dots and their application as a “turn-off” fluorescent probe in the detection of Fe³⁺ ions. *RSC Advances*, v. 6, n. 34, p. 28745–28750, 2016.
- [60] SKOOG, D.A; WEST, D.M; HOLLER, F.J; CROUCH, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª ed. Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2006.
- [61] SCHERER, R; WAGNER, R; DUARTE, M.C.T; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- [62] MARTINS, G.S.O ; ZAGO, H.B ; COSTA, A.V ; JUNIOR, L.M.A ; CARVALHO, J.R. Chemical composition and toxicity of citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Rev. Caatinga*, Mossoró, v. 30, n. 3, p. 811-817, Sept. 2017.
- [63] KIM, S; CHEN, J; CHENG, T; GINDULYTE, A; HE, J; HE, S; LI, Q; SHOEMAKER, B.A; THIESSEN, P.A; YU, B; ZASLAVSKY, L; ZHANG, J; BOLTON, E.E.. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 2018.
- [64] ELLING, Axel A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*, 103, pp. 1092-1102, 2013.

8 ANEXO



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 002179 6

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOFORMULAÇÕES BIOPESTICIDAS BASEADAS EM METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E MICRONUTRIENTES, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO NO CONTROLE DE PATÓGENOS E PRAGAS

Resumo: A presente invenção situa-se no campo da nanotecnologia. Trata-se de nanoformulações baseadas em Carbon-dots e cobre e Carbon-dots e óleos essenciais de citronela, cravo e laranja doce. Tais nanoformulações possuem atividade antifúngica e larvicida, portanto, úteis para o desenvolvimento de biopesticidas a serem utilizados no controle de patógenos e pragas.

Figura a publicar: 2