

MORGANA COELHO MAMEDE

DETECÇÃO DE *Pantoea ananatis* EM SEMENTES DE MILHO E NANOPARTÍCULAS  
NO CONTROLE DA BACTÉRIA *IN VITRO*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M264d Mamede, Morgana Coelho, 1991  
2018 Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho e nanopartículas no controle da bactéria *in vitro* / Morgana Coelho Mamede. - 2018.  
77 f. : il.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.754>  
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Milho - Doenças e pragas - Controle - Teses. 3. Bactérias fitopatogênicas - Teses. 4. Milho - Sementes - Teses. I. Tebaldi, Nilvanira Donizete. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

---

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

MORGANA COELHO MAMEDE

DETECÇÃO DE *Pantoea ananatis* EM SEMENTES DE MILHO E NANOPARTÍCULAS  
NO CONTROLE DA BACTÉRIA *IN VITRO*

APROVADA em 19 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Alison Talis Martins Lima

UFU

Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva

UFU

Prof. Dr. Igor Souza Pereira

IFTM



Nilvanira Donizete Tebaldi  
Prof.ª Dr.ª Nilvanira Donizete Tebaldi  
(Orientadora)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2018

Aos meus pais Núbia Aparecida da Silva Mamede e Waldemar Martins Mamede.  
À minha avó Hilda Coelho da Silva.  
Aos meus familiares e amigos.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de formação profissional.

Ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Nilvanira Donizete Tebaldi pela confiança, apoio e ensinamentos.

À técnica do Laboratório Lara Caroline Borges Moreira Mota pelo auxílio, pelas sugestões e ensinamentos.

Aos professores Dr. Igor Souza Pereira e Dra. Anielle Christine Almeida Silva pela gentileza e disponibilidade em compor minha banca de defesa de dissertação.

Aos amigos de Pós-Graduação, especialmente a Nayara e Raquel, pelas contribuições e incentivo, além da importante participação na execução deste trabalho.

Aos demais amigos pelos momentos compartilhados, em especial Guilherme, César, Thiago, Thales e Sérgio por tornar os dias mais agradáveis.

A Camila, Juliana e Roberta pela torcida, apoio e por compartilhar comigo esta realização.

Aos meus tios, primos e avós pela torcida.

Aos meus pais pelo constante apoio.

A todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Acima de tudo, agradeço a Deus.

## RESUMO

A mancha branca do milho causada pela bactéria *Pantoea ananatis* é considerada uma das principais doenças foliares da cultura do milho no Brasil. As estratégias de controle da doença são baseadas na obtenção de genótipos resistentes e no controle químico. Como nova estratégia, vários nanomateriais têm sido utilizados como agentes antimicrobianos por eliminar ou retardar o crescimento bacteriano. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: (i) avaliar meio de cultura semi-seletivo para detecção de *P. ananatis*; (ii) detectar a presença de *P. ananatis* em sementes de oito genótipos de milho; (iii) identificar e caracterizar bioquímica e molecularmente os isolados bacterianos; (iv) avaliar o efeito de nanopartículas no controle da bactéria *in vitro*. Para avaliação dos meios de cultura, foram utilizados dois isolados de *P. ananatis* em cinco meios de cultura (523, NA, TSA, PA10 e PA20) com ausência ou presença dos fungicidas ciclohexamida e tiofanato metílico, com três repetições cada. A eficiência de cada meio de cultura foi determinada a partir do diâmetro das colônias e contagem do número de colônias em UFC mL<sup>-1</sup>. Para detecção da bactéria nas sementes foram utilizados oito genótipos de milho, os extratos das sementes foram cultivados em três meios de cultura (523, NA e TSA) com três repetições para cada diluição. Os isolados obtidos foram caracterizados bioquímica, fisiologicamente e molecularmente. Para controle com nanopartículas foram utilizados nanocristais de ZnO dopados com seis elementos: prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e níquel (Ni) em diferentes concentrações e nanocristais puros, com três repetições. A toxidez direta dos nanocristais foi avaliada através do halo de inibição do crescimento bacteriano (isolado de *Pantoea ananatis*) em meio de cultura. Os meios de cultura TSA e 523 com adição de ciclohexamida foram eficazes para a detecção de *P. ananatis*. A bactéria foi encontrada em sementes de cinco genótipos de milho. O meio de cultura TSA com adição de ciclohexamida pode ser recomendado para a detecção de *P. ananatis* em sementes de milho. A utilização de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) não apresentou efeito bactericida para *P. ananatis*. Nanocristais de ZnO dopados com cobre, ferro, manganês, níquel, ouro e prata inibiram o crescimento de *P. ananatis* *in vitro*.

Palavras-chave: Etiologia; *Zea mays*; Mancha branca.

## ABSTRACT

The white corn stain caused by the bacterium *Pantoea ananatis* is considered one of the main foliar diseases of maize in Brazil. The control strategies of the disease are based on obtaining resistant genotypes and chemical control. As a new strategy, several nanomaterials have been used as antimicrobial agents to eliminate or retard bacterial growth. The objective of this study was to (i) evaluate semi-selective culture medium for the detection of *P. ananatis*; (ii) to detect the presence of *P. ananatis* in seeds of eight maize genotypes; (iii) to identify and characterize biochemistry and molecularly the bacterial isolates; (iv) to evaluate the effect of nanoparticles in the control of the bacterium in vitro. To evaluate the culture media, two isolates of *P. ananatis* were used in five culture media (523, NA, TSA, PA10 and PA20) with absence or presence of the fungicides cyclohexamide and methyl thiophanate, with three replicates each. The efficiency of each culture medium was determined from the diameter of the colonies and counting of the number of colonies in CFU mL<sup>-1</sup>. Eight maize genotypes were used to detect the bacteria in the seeds, the seed extracts were grown in three culture media (523, NA and TSA) with three replicates for each dilution. The obtained isolates were characterized biochemically, physiologically and molecularly. In order to control with nanoparticles, ZnO nanocrystals doped with six elements: silver (Ag), gold (Au), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn) and nickel (Ni) in different concentrations and pure nanocrystals, with three replicates. The direct toxicity of the nanocrystals was evaluated through the halo of bacterial growth inhibition (*Pantoea ananatis* isolate) in culture medium. TSA and 523 culture media with addition of cyclohexamide were effective for the detection of *P. ananatis*. The bacterium was detected in seeds of five maize genotypes. TSA culture medium with addition of cyclohexamide may be recommended for the detection of *P. ananatis* in corn seeds. The use of zinc oxide (ZnO) nanoparticles did not present a bactericidal effect for *P. ananatis*. ZnO nanocrystals doped with copper, iron, manganese, nickel, gold and silver inhibited the growth of *P. ananatis* in vitro.

Key-words: Etiology; *Zea mays*; White spot.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Mecanismo de fotocatálise de um semicondutor:  $h\nu$  (partícula pura).

### **CAPÍTULO 1. DETECÇÃO DE *Pantoea ananatis* EM SEMENTES DE MILHO**

**FIGURA 1.** *Pantoea ananatis* nos meios de cultura TSA, 523, NA, PA10 e PA20 com adição de ciclohexamida; com adição de tiofanato metílico e sem fungicida.....43

### **CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE *Pantoea ananantis* IN VITRO**

**FIGURA 1.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de cobre em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.1 Cu, (B) ZnO 0.4 Cu, (C) ZnO 1.0 Cu, (D) ZnO 4.0 Cu, (E) ZnO 12.0 Cu, (F) CuO, (G) ZnO. A= água, E= estreptomicina.....61

**FIGURA 2.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de ferro em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.05 Fe, (B) ZnO 0.5 Fe, (C) ZnO 3.0 Fe, (D) ZnO 7.0 Fe, (E) ZnO 11.0 Fe, (F) FeO, (G) ZnO. A= água, E= estreptomicina.....63

**FIGURA 3.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de manganês em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.2 Mn, (B) ZnO 0.4 Mn, (C) ZnO 0.8 Mn, (D) ZnO 4.0 Mn, (E) ZnO 8.0 Mn, (F) ZnO 12.0 Mn (G), MnO, (H) ZnO. A= água, E= estreptomicina.....65

**FIGURA 4.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de níquel em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.7 Ni. (B) ZnO 1.0 Ni. (C) ZnO 3.0 Ni. (D) ZnO 11.0 Ni. (E) NiO. (F) ZnO. A= água, E= estreptomicina.....67

**FIGURA 5.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de ouro em diferentes concentrações. (A) ZnO 0,1 Au. (B) ZnO 0,5 Au. (C) ZnO 1,0 Au. (D) ZnO 5,0 Au. (E) ZnO 10,0 Au. (F) Au. (G) ZnO. A= água, E= estreptomicina.....69

**FIGURA 6.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de prata em diferentes concentrações. (A) ZnO 0,7 Ag. (B) ZnO 1,0 Ag. (C) ZnO 3,0 Ag. (D) ZnO 7,0 Ag. (E) ZnO 9,0 Ag. (F) ZnO 11,0 Ag. (G) Ag<sub>2</sub>O, (H) ZnO. A= água, E= estreptomicina.....71

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1. DETECÇÃO DE *Pantoea ananatis* EM SEMENTES DE MILHO**

**TABELA 1.** Diâmetro (mm) das colônias de *Pantoea ananatis* em diferentes meios de cultura, com e sem a adição de fungicidas. Uberlândia – MG.....44

**TABELA 2.** Detecção de *Pantoea ananatis* em diferentes meios de cultura, em unidades formadoras de colônia. Uberlândia – MG.....45

**TABELA 3.** Detecção de *Pantoea ananatis* na presença e ausência de fungicidas, em unidades formadoras de colônia. Uberlândia – MG.....45

**TABELA 4.** Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de diferentes genótipos de milho, nos meios de cultura 523, NA e TSA, com adição de ciclohexamida. Uberlândia – MG.....47

### **CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE *Pantoea ananantis* IN VITRO**

**TABELA 1.** Nanocristais em suas respectivas concentrações. Uberlândia - MG, 2017.....58

**TABELA 2.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Cu em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.....60

**TABELA 3.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Fe em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.....62

**TABELA 4** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Mn em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.....64

**TABELA 5.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Ni em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.....66

**TABELA 6.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Au em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.....68

**TABELA 7.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Ag em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.....70

# Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 A cultura do milho.....	13
2.2 Mancha branca do milho .....	14
2.2.1 Aspectos gerais da doença .....	14
2.2.2 Etiologia da doença.....	15
2.3 Gênero <i>Pantoea</i> .....	16
2.3.1 <i>Pantoea ananatis</i> : agente causal da mancha branca do milho.....	16
2.4 Fitobactérias em sementes.....	18
2.5 Nanociênci.....	19
2.6 Nanobiotecnologia.....	20
2.7 Nanopartículas com propriedades antimicrobianas.....	21
2.7.1 Nanopartículas de óxido de zinco .....	21
2.7.2 Uso de óxido de zinco dopado .....	22
REFERÊNCIAS .....	24
CAPÍTULO 1. DETECÇÃO DE <i>Pantoea ananatis</i> EM SEMENTES DE MILHO .....	34
RESUMO .....	34
ABSTRACT .....	35
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
2.1. Preparo da suspensão bacteriana .....	38
2.2 Meios de cultura para detecção de <i>Pantoea ananatis</i> .....	38
2.3 Detecção de <i>Pantoea ananatis</i> em sementes de milho.....	38
2.3.1 Teste de patogenicidade no hospedeiro .....	39
2.3.2 Caracterização molecular, reação em cadeia da polimerase.....	39

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1	Meios de cultura para detecção de <i>Pantoea ananatis</i> .....	41
3.2	Detectão de <i>Pantoea ananatis</i> em sementes de milho.....	44
4.	CONCLUSÕES .....	47
	REFERÊNCIAS .....	48
	CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE <i>Pantoea ananatis</i> IN VITRO .	52
	RESUMO .....	52
	ABSTRACT .....	53
1.	INTRODUÇÃO .....	54
2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	56
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
4.	CONCLUSÕES .....	72
	REFERÊNCIAS .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do milho (*Zea mays L.*) alcançou em 2017 uma produção de 97,71 milhões de toneladas, distribuídas entre a primeira safra de 30,46 milhões de toneladas e a segunda safra de 67,25 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

O cultivo do milho de segunda safra ou milho safrinha trouxe preocupações quanto ao manejo, devido às flutuações climáticas que geram mudanças na incidência de pragas, plantas infestantes e doenças (CRUZ E BIANCO, 2001). Entre as doenças, destaca-se a Mancha Branca do Milho (MBM) tanto pela sua distribuição geográfica, quanto pelos prejuízos causados.

Presente no país desde a década de 1980, a doença inicia-se com o aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, com coloração verde-escuro que evoluem para necróticas e de cor palha, afetando, assim, a taxa fotossintética líquida da planta e levando a perdas superiores a 60% na produção final (PINTO, 1999; CASELA et al., 2006). *Pantoea ananatis* é o agente causal da doença (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), trata-se de uma bactéria gram-negativa, não esporulante, anaeróbia facultativa, com colônias de coloração amarelo brilhante e crescimento mucoso quando em meio de cultura, além disso sobrevive epifíticamente sobre as folhas do milho, assim como em restos culturais (SAUER et al., 2010).

A importância das bactérias como patógenos de plantas se dá pela severidade das doenças que provocam em culturas de interesse econômico, bem como pela sua rápida disseminação e dificuldades em controlá-las. Estes atributos estão associados à alta adaptabilidade que as bactérias apresentam, capacitando sua sobrevivência em diversas condições, tais como: diferentes climas, estádios fenológicos de hospedeiro e a capacidade em desenvolver resistência a defensivos utilizados para seu controle (ROMEIRO, 2005).

A disseminação de *P. ananatis* na cultura do milho pode ocorrer pelo homem, animais, insetos, chuvas, ventos e enxurradas (MENDES e TEBALDI, 2011). Segundo Sauer et al. (2010), o inóculo primário da bactéria tem origem nos restos culturais do milho. Rijavec et al. (2007) sugeriram provável transmissão vertical endofítica de *P. ananati*, planta mãe doente produzindo sementes contaminadas, mesmo após desinfestação superficial de grãos de milho e posterior germinação sob condições assépticas. Recentemente, a bactéria foi detectada em sementes de milho (MAMEDE et al., 2018).

Sendo assim, as estratégias de controle da doença são baseadas na obtenção de genótipos resistentes e no controle químico. No entanto, o controle químico de fitobactérias não é eficiente e,

por isso, métodos alternativos devem ser avaliados, como o uso de nanomateriais com ação antimicrobiana. Com tamanho inferior a 100 nm, nanopartículas (NPs) apresentam elevada eficácia biocida, já que o pequeno tamanho e a alta relação superfície/volume admite interações íntimas com as membranas microbianas (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos detectar a presença de *P. ananatis* em sementes de milho em meio de cultura e avaliar o efeito de nanopartículas no controle da bactéria *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do milho

A cultura do milho (*Zea mays* L.) apresentou como os maiores produtores mundiais os Estados Unidos, a China e o Brasil, com uma produção de 384,8, 219,6 e 97,7 milhões de toneladas, respectivamente, na safra 2016/2017 (FIESP, 2017), sendo utilizado principalmente em rações para animais (FORNASIERI FILHO, 2007; MÔRO e FRITSCHE NETO, 2015).

No Brasil, o milho representa a segunda espécie vegetal mais cultivada, ficando atrás apenas da soja. Entretanto, sua importância no mercado agroindustrial nacional não é menor frente a principal *commodity*, visto que em anos ruins para a soja, o milho gera ganhos financeiros para grande parte dos produtores rurais (MÔRO e FRITSCHE NETO, 2015).

A produção de grãos na safra 2016/17 ocupou área de 60,9 milhões de hectares, maior área semeada da história, sendo que 85% desta área está concentrada nas culturas da soja e do milho. Além disso, dados estimados da área de milho total no país denotam 17,68 milhões de hectares (CONAB, 2017). Apesar da vasta extensão territorial, algumas regiões e estados destacam-se por concentrar o cultivo do milho. Lideram tanto em área cultivada, quanto em produtividade e produção a região Centro-Oeste, especificamente nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás.

A cultura é distribuída em duas safras, primeira e segunda safra. De acordo com levantamento da CONAB (2017), para primeira safra houve semeadura em 5,48 milhões de hectares e para segunda safra 12,11 milhões de hectares, sendo que devido às condições climáticas que favoreceram a cultura e a produtividade, o milho da segunda safra alcançou  $5.533 \text{ kg ha}^{-1}$ , permanecendo como a segunda melhor da série histórica.

O rendimento da cultura depende de vários fatores, como potencial produtivo do genótipo, resistência às doenças, fertilidade do solo, densidade adequada de plantas, sistema de cultivo, sistema de semeadura, manejo de pragas e doenças além das condições ambientais (DENTI; REIS, 2003).

Contudo, as modificações ocorridas ao longo dos anos no sistema de produção, como expansão da fronteira agrícola, adoção do sistema de plantio direto, aumento da população de plantas, condições climáticas favoráveis, além de cultivos sucessivos de milho na mesma área, geraram condições ideais para o desenvolvimento de várias doenças foliares (PAES, 2006).

Assim, apesar do aumento na produtividade, modificações importantes ocorreram na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no aparecimento de novos problemas fitossanitários. A importância de cada doença varia de ano para ano e de região para região, porém algumas das doenças são de ocorrência mais generalizada nas principais regiões de plantio, como a Mancha Branca do Milho (MBM) (PAES, 2006).

## **2.2 Mancha branca do milho**

### **2.2.1 Aspectos gerais da doença**

Também conhecida como pinta branca, a mancha branca do milho (MBM) é considerada uma doença endêmica em quase todas as regiões produtoras de milho no Brasil. Causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; PACCOLA-MEIRELLES, 2008; BOMFETI et al., 2008), trata-se de uma das mais importantes doenças foliares do milho.

As perdas são dependentes das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento no qual a planta é infectada. Regiões acima de 600m de altitude e semeadura a partir da segunda quinzena de novembro aumentam a severidade da doença, assim como plantios tardios permitem que a cultura se desenvolva sob elevadas precipitações pluviométricas, criando condições adequadas ao desenvolvimento da doença (COSTA et. al., 2011).

Além do clima, fatores como manejo da adubação, época de semeadura e método de plantio empregado podem predispor as plantas ao ataque. A semeadura direta pode elevar o potencial de inóculo na área ao longo do tempo (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000), a fertilidade do solo e nutrição da planta também são aspectos importantes e intrínsecos a resistência da planta à doença. Outrossim, desequilíbrios nutricionais aumentam o estresse da cultura e a probabilidade de doenças aumenta (YAMADA, 2002).

A alta incidência e a severidade com que a MBM ocorre contribui para a redução dos índices de produtividade da cultura. Em genótipos suscetíveis a MBM antes ou depois do florescimento pode

provocar um aspecto de queima intensa na planta, reduzindo o ciclo da cultura devido a redução da área fotossintética, visto que 10-20% de severidade representa 40% menos de fotossíntese líquida, o que equivale a 60% de perdas na produção final da cultura (PINTO, 1999; GODOY et al., 2001).

O início da doença se dá com o surgimento de lesões aquosas, do tipo anasarca, de coloração verde-escuro e que evoluem para lesões necróticas e de coloração palha. São lesões de formato oblongo e irregular, medindo entre 0,3 a 2,0 cm, dependendo do nível de resistência genética do material (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002). Na maioria dos genótipos de milho os sintomas iniciam-se nas folhas inferiores, progredindo em direção ao ápice da planta e ficando mais severos após o pendoamento (SAWAZAKI et al., 1997).

Dentre as medidas de controle, são indicados o uso de híbridos resistentes e, no caso de plantio de cultivares suscetíveis, a utilização de fungicidas tem sido ajustada em produtos pertencentes aos grupos: triazóis, estrobilurinas, benzimidazol e oxitetraciclín (PEDRO et al., 2010).

### **2.2.2 Etiologia da doença**

Inicialmente o agente causal foi descrito por Fantin (1994) como mancha foliar de *phaeosphaeria*, causada por *Phaeosphaeria maydis* (Henn.) Rane (CARSON, 1999).

No Brasil, o diagnóstico da doença era realizado considerando apenas os aspectos visuais das lesões na planta, além de descrições das estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas presentes nas lesões (FANTIN, 1994). Entretanto, o baixo índice de isolamento do fungo *P. maydis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; CERVELATTI et al., 2002; AMARAL et al., 2004; 2005; CARLI, 2008) somado a dificuldade em encontrar estruturas características de *P. maydis* (peritécios) ou *Phyllosticta* sp (picnídios) (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1998; FERNANDES, 2004) apontaram a necessidade de estudos mais detalhados sobre a doença.

Diante disso, a partir de inoculações com a bactéria *Pantoea ananatis* em condições controladas, Paccola-Meirelles et al. (2001) observaram sintomas típicos da doença entre 5 a 7 dias após a inoculação. Assim sendo, os autores confirmaram os postulados de Koch e descreveram a bactéria como agente causal da doença. Corroborando o relato, Vieira et al. (2009) sugeriram a interação entre a bactéria *P. ananatis* com as diferentes espécies de fungos, como necessária a reprodução dos sintomas da doença.

*P. ananatis* está presente desde os primeiros estádios de desenvolvimento das lesões de MBM, enquanto diferentes espécies de fungos aparecem apenas em lesões de estádio avançado. Contudo, diferentes espécies de fungos oportunistas podem colonizar as lesões pré-estabelecidas pela bactéria, incluindo aquelas descritas como sendo o agente etiológico da doença (GONÇALVES et al., 2013).

Além disso, os resultados apresentados por Gonçalves et al. (2013) mostraram que o crescimento de diferentes espécies fúngicas encontradas frequentemente em lesões naturais da doença também ocorrem em lesões artificiais. Esse conjunto de resultados apoia a hipótese de que a doença MBM é causada pela bactéria *Pantoea ananatis* conforme descrito por Paccolla-Meirelles et al. (2001), e não por uma espécie-específica de fungo ou mesmo um complexo de espécies fúngicas conforme relatado anteriormente (RANE et al., 1966; FANTIN, 1994; AMARAL et al., 2004, 2005; CARSON, 2005; CARLI, 2008).

### **2.3 Gênero *Pantoea***

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, as bactérias pertencentes ao gênero *Pantoea* são gram-negativas, não capsuladas, de formato alongado, não esporulante; a maioria se move com auxílio de flagelos peritríquios; anaeróbias facultativas, ou seja, bactérias fermentativas; oxidase negativo e catalase positivo; em nutriente ágar as colônias são redondas, mucoides de coloração amarela, creme / branca ou bege.

O gênero *Pantoea* é atualmente composto por 20 espécies reconhecidas que são fenotipicamente similares: *P. agglomerans*, *P. allii*, *P. ananatis*, *P. anthophila*, *P. beijingensis*, *P. brenneri*, *P. calida*, *P. conspicua*, *P. cypripedii*, *P. deleyi*, *P. dispersa*, *P. eucaleptii*, *P. eucrina*, *P. gavinae*, *P. rodasii*, *P. rwandensis*, *P. septica*, *P. stewartii* subsp. *indologenes*, *P. stewartii* subsp. *stewartii*, *P. vagans*, *P. wallisii*. Apesar de isoladas de várias fontes, a maioria foi retirada de plantas (WALTERSON e STAVRINIDES, 2015).

Por meio do mecanismo chamado quórum-sensing ocorre comunicação de uma substância química sinalizadora denominada acil-homoserinas lactonas. Esta substância produz um exopolissacarídeo que protege a célula bacteriana de mecanismos de defesa do hospedeiro e obstrui a circulação da seiva nas folhas que originam o tecido necrosado. Em relação à virulência, o patógeno produz cristais de gelo em temperaturas onde não poderiam ser formados, fenômeno da “ice nucleation”, que em culturas que não toleram o congelamento do meio intercelular faz com que as lesões sejam exteriorizadas; como na cultura do milho (GONÇALVES et al., 2015).

#### **2.3.1 *Pantoea ananatis*: agente causal da mancha branca do milho**

*P. ananatis* causa doenças em diversas culturas como melão, cebola, aveia e tomate (WELLS et al., 1987; WATANABE et al., 1996; GITAITIS et al., 1997; AZAD et al., 2000; COTHER et al., 2004). Em milho foi descrita pela primeira vez no Brasil por Paccolla-Meirelles et al. (2001), na África

do Sul por Gosczynska et al. (2007), no México por Pérez-y-Terrón et al. (2009), na Argentina por Alippi e López (2010) e na Polônia por Krawczyk et al. (2010).

A bactéria sobrevive epifiticamente em folhas de milho, a população pode progredir em tamanho mesmo na ausência da manifestação da doença sobre as folhas. A idade e estrutura da planta também contribuem para o aumento da população bacteriana (SAUER et al., 2010).

Dentre as características que podem favorecer o crescimento epífítico no filoplano estão a pilosidade, densidade estomática e taxa de transpiração (COSTA et al., 2006). Isso ocorre visto que a frequência de isolamento desta bactéria é 63% maior em estágios iniciais de desenvolvimento das lesões em plantas de milho, diminuindo consideravelmente em estágios seguintes (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

Gitaitis et al. (2002) identificaram a bactéria *P. ananatis* na forma epífita em 25 plantas infestantes assintomáticas e também plantas de feijão caupi e soja, utilizando PCR com *primers* específicos, sendo as plantas infestantes as prováveis fontes de inóculo para os plantios de cebola nos EUA.

Lesões de *P. ananatis* também foram encontradas em plantas de sorgo e folhas de capim-colchão, planta infestante muito comum em lavouras de milho (LANA et al., 2012), onde as lesões apresentavam variabilidade morfológica semelhante à descrita para diferentes genótipos de milho. Além disso, plantas de capim carrapicho e caruru, quando inoculadas com a bactéria, também apresentaram sintomas de mancha branca, de onde a bactéria foi reisolada (MARTINS, 2014). Desta forma, acredita-se que estas plantas infestantes sejam hospedeiros alternativos com alto potencial para que a bactéria se desenvolva nas áreas de plantio do milho.

Sementes de milho quando desinfestadas e colocadas para germinar, sob condições assépticas, mostrou-se possível o isolamento da bactéria e sua confirmação pelo sequenciamento de DNA utilizando *primers* universais U986/L1401 (RIJAVEC et al., 2007). Após reisolamento da bactéria a partir de grãos colhidos em duas semeaduras consecutivas, foi sugerido que, no milho, pode ocorrer uma provável transmissão vertical endofítica (planta mãe doente produzindo sementes contaminadas). A bactéria também já foi detectada em sementes de milho (MAMEDE et al., 2018) e pode ser transmitida pelas sementes de cebola (WALCOTT et al., 2002), capim-sudão (AZAD et al., 2000), arroz (TABEI et al., 1988) e trigo sarraceno (IIMURA e HOSONO, 1996).

Por isso, conhecer o funcionamento de agroecossistemas, bem como identificar nichos de sobrevivência de fitopatógenos, bem como suas interações com o hospedeiro e ambiente são

fundamentais para estabelecer práticas adequadas de manejo visando seu controle (VALARINI e SPADOTTO, 1995).

## 2.4 Fitobactérias em sementes

Aproximadamente 90% das culturas exploradas agronomicamente são propagadas por sementes. As sementes podem abrigar e transportar microrganismos ou agentes patogênicos de todos os grupos taxonômicos, causadores e não causadores de doenças. Os fungos englobam o maior número de espécies associadas às sementes, seguidos pelas bactérias, com um número expressivo de representantes, e os vírus e nematoides em menor número (BRASIL, 2009).

Bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes de diferentes formas, aderidas aos tricomas, ao tegumento ou embrião e, ou sob o tegumento e serem eficientemente transmitidas para as plantas em condições de viveiro ou campo (SCHAAD, 1982; GOTO, 1992; SILVA et al., 2002; ROMEIRO, 2005).

A semente aloja diversificada flora microbiana, tanto na superfície, quanto associada aos tecidos internos (NORMANDER e PROSSER, 2000; BACILIO-JIMENEZ et al., 2001), cuja proliferação é estimulada durante a embebição, no início do processo de germinação (BUYER et al., 1999; SIMON et al., 2001; NELSON, 2004). A eficiência da transmissão de fitobacterioses pelas sementes está relacionada com as condições ambientais, como temperatura, umidade e pH, além da flora microbiana presente na semente e no substrato (ROMEIRO, 2005).

Na maioria das vezes a semente infectada não apresenta sintomas, já que as bactérias podem sobreviver nas sementes em baixas populações, tendo seu desenvolvimento paralisado (BRASIL, 2009). As técnicas de detecção apresentam grandes variações quanto à sensibilidade, especificidade e complexidade em relação à semente e bactéria analisada (KRUPPA, 1993), de modo que não existe uma metodologia uniformizada e que atende a diferentes necessidades. Dessa maneira, a escolha do método deve ser ajustada a cada sistema biológico (SCHAAD, 1982).

Entre os métodos disponíveis para detecção de bactérias em sementes temos o uso de meios de cultura não seletivos, por exemplo em *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolada em meio King B (TAYLOR, 1970) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em meio amido-nutriente-ágar (SCHAAD; DONALDSON, 1980). Entretanto, de acordo com Oliveira (1995) o uso de meios não seletivos em rotina apresenta baixa sensibilidade, visto que o lote de sementes deve estar altamente contaminado com a bactéria alvo e a microflora saprofítica deve estar em baixas quantidades.

Dessa forma, a utilização de meios de cultura semi-seletivos, com alta supressividade para microrganismos saprófitas e baixa repressividade para a bactéria fitopatogênica é ferramenta valiosa

na fitobacteriologia (ROMEIRO, 2001). Na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em análise de rotina de sanidade de sementes, Zachowski e Rudolph (1988) desenvolveram um meio de cultura semi-seletivo o qual possibilitou a verificação de colônias individualizadas após 3 a 5 dias de incubação. Soares (2006) obteve resultados semelhantes ao detectar *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em placas de Petri, permitindo o isolamento do patógeno com baixo índice de contaminantes. Também na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* em sementes de soja com o uso do meio semi-seletivo MXG com antibióticos apresentou alta eficácia devido à baixa repressividade e alta supressividade (VIOLATTI e TEBALDI, 2016).

A alta qualidade das sementes é a base para a elevação da produtividade agrícola (BORÉM e MIRANDA, 2013). Em um programa de certificação de sementes, o estabelecimento de uma metodologia reproduzível e confiável para a detecção de patógenos em análises de rotina, é de grande interesse. Com os resultados pode-se evitar o uso de sementes de qualidade sanitária duvidosa (BRASIL, 2009).

Assim, a identificação de *P. ananatis* em sementes de milho é de suma importância, visto que esforços para controlar a qualidade comercial das sementes produzidas concentram-se na detecção de fungos e pouco é conhecido referente a detecção da bactéria (GOSZCZYNSKA et al, 2006).

## 2.5 Nanociênciа

A ciência que estuda os materiais em escala nanométrica é chamada nanociênciа. A nanociênciа, aplicada a tecnologias, nanotecnologias, é uma abordagem inovadora à investigação e desenvolvimento do controle, do tamanho, forma e composição de nanomateriais (ADAMS e BARBANTE, 2013).

A nanotecnologia envolve a manipulação de materiais de tamanho nanométrico, variando entre 1 a 100 nanômetros, destacando que um nanômetro (nm) é um bilionésimo de um metro ( $10^{-9}$  m). Materiais nestas dimensões, designados nanomateriais, possuem características físicas, químicas e biológicas únicas e que permitem aplicações inovadoras dos mesmos (NNI, 2017).

Processos biológicos ocorrem a nível molecular com interações de tamanho em escala nanométrica, motivando o uso de nanomateriais. Basicamente, a biologia analítica e a bioquímica evoluem em torno da determinação de propriedades moleculares básicas relacionadas ao tamanho, peso e posição. Além disso, existe uma interação complexa entre moléculas nos sistemas vivos, resultando em uma alteração contínua dessas propriedades ao nível molecular (ADAMS e BARBANTE, 2013).

Os nanomateriais têm sido utilizados para várias finalidades, como na indústria alimentícia para a detecção de patógenos nos alimentos (SOZER e KOKINI, 2009); no tratamento de água e efluentes, a aplicação de nanotubos de carbono proporciona maior capacidade de adsorção de compostos orgânicos do que o carvão ativado (PAN e XING, 2008); e, por fim, na detecção de materiais tóxicos na atmosfera através de nanosensores (SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005).

## 2.6 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia trata da junção entre nanotecnologia com a área biológica. O tamanho dos nanomateriais favorece sua entrada nas células proporcionando o acesso de drogas e reconhecimento de proteínas específicas (BHATTACHARYYA et al., 2009; RASMUSSEN et al., 2010).

Os materiais nanoestruturados possuem propriedades físicas e químicas dependentes da escala, ou seja, as nanopartículas apresentam comportamento intermediário entre o molecular e o sólido (LIN et al., 2005; LIN et al., 2006; PEARTON et al., 2004; BAHNEMANN et al., 1987). Tais materiais tem suas propriedades físicas e químicas potencializadas, o que gerou grande interesse nas aplicações tecnológicas (NOGUEIRA, 2013). Os nanomateriais estão na mesma escala de tamanho que as proteínas, DNA e vírus, sendo menores ainda que uma célula ( $10^4$  a  $10^5$  nm) (WICHLAB, 2016).

A síntese de nanopartículas, com tamanho de 1 a 100nm, tem sido objeto de inúmeros trabalhos científicos (SILVA et al., 2010). As propriedades físico-químicas singulares de vários nanomateriais tornaram possível a criação de novas estruturas, sistemas ou dispositivos com aplicações potenciais em diversas áreas (ZHANG et al., 2013; MONTALT et al., 2014). Um nanocrystal é definido como “partícula manométrica, composta de algumas centenas ou dezenas de átomos, dispostos ordenadamente, de acordo com uma estrutura cristalina. O arranjo do cristalino termina na superfície do cristal, os átomos da superfície possuem menos vinhos que aqueles do interior do cristal. O formato do nanocrystal deve minimizar a energia livre, ou tensão superficial. Devido à elevada superfície de exposição, os nanocristais podem ser quimicamente muito reativos e instáveis.” (ANJOS et al., 2006).

As metodologias de síntese de nanopartículas são divididas em duas categorias: métodos físicos e métodos químicos. Nos métodos físicos os materiais sofrem moagem, têmpora, decomposição térmica, irradiação, dentre outros, nos quais o nanomaterial é formado a partir de uma amostra maior que ele. Nos métodos químicos as nanopartículas são formadas por meio de reações químicas entre íons ou moléculas (HABIBA et al., 2014).

## **2.7 Nanopartículas com propriedades antimicrobianas**

Uma das grandes descobertas da nanotecnologia foi o fato de que, em cada tamanho, um mesmo material pode apresentar características físicas e químicas completamente diferentes (ALIVISATOS, 1997).

A atividade antimicrobiana é determinada por compostos que eliminam as bactérias localmente ou retardam seu crescimento sem prejudicarem o tecido circundante (HAJIPOUR et al., 2012). O uso de nanomaterias como agentes antimicrobianos vem ganhando espaço, uma vez que nanopartículas com tamanho inferior a 100 nm apresentam elevada eficácia biocida. Nesse sentido, o tamanho manométrico resulta em alta relação superfície/volume que admite interações íntimas com as membranas microbianas (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005).

### **2.7.1 Nanopartículas de óxido de zinco**

As nanopartículas de óxido de zinco ( $ZnO$ ) tem sido amplamente usadas na indústria têxtil e farmacologia, devido a suas propriedades de alta relação superfície/volume, baixa toxidez, biocompatibilidade, barato e de fácil síntese, (KWON et al., 2014; SHI et al., 2014; SINGH e NANDA, 2014; WILLANDER et al., 2014). Partículas nanométricas quando usadas como catalisadoras tem sua atividade catalítica reforçada devido a sua maior área superficial, e também devido às alterações da superfície, como alta concentração de defeitos e a efeitos de confinamento quântico (ULLAH et al., 2008; HARIHARAN, 2006; STROYUK et al., 2005; KURBANOV et al., 2007; ZHANG et al., 2004).

O  $ZnO$  apresenta características bactericidas, sendo capaz de combater tanto os microrganismos quanto seus esporos (SAWAI et al., 1996a), seus mecanismos de toxicidade ainda não são totalmente conhecidos nos níveis celular e molecular (MEYER et al., 2011; von MOOS e SLAVEYKOVA, 2014). O formato, tamanho e a concentração das nanopartículas de  $ZnO$  influenciam sua atividade antibacteriana, uma vez que a forma esférica da nanopartícula de  $ZnO$  dificulta a penetração nas paredes celulares bacterianas em relação aquelas com formato de bastão ou fio (YANG et al., 2009). O uso de nanopartícula de  $ZnO$  com menor tamanho aumentam sua capacidade de penetração (ZHANG et al., 2007; YAMAMOTO, 2001; SAWAI et al., 1996b) e quanto maior sua concentração e superfície de contato, maior a atividade antimicrobiana de  $ZnO$  (YAMAMOTO, 2001).

O efeito bactericida das nanopartículas de  $ZnO$  pode ser explicado pelo aumento do nível intracelular de espécies reativas de oxigênio, vazamento da membrana plasmática, disfunção das

mitocôndrias, dano celular, genotoxicidade (efeito tóxico sobre o material genético) e morte (apoptose) (FUKUI et al., 2012; SHARMA et al., 2012; WANG et al., 2014).

## 2.7.2 Uso de óxido de zinco dopado

Uma forma de ajustar as propriedades dos óxidos funcionais é alterar sua estrutura física e eletrônica por meio da dopagem. A incorporação de novos elementos na estrutura reticular altera o posicionamento das bandas de condução e valência, modificando os mecanismos de difusão, crescimento de grão e sintetização, modificando características químicas como acidez da superfície e criando sítios de adsorção (CALLISTER, 2002).

A incorporação/dopagem de íons metálicos como: Cu, Co, Ni, Cr, Mn, Mo, Nb, V, Fe, Ru, Au, Ag, Pt na estrutura do material, reduz o band gap (faixa de energia em um sólido onde nenhum estado de elétrons pode existir). Com base no mecanismo de fototividade dos semicondutores, a dopagem destes favorece a fotoativação pela luz visível devido ao surgimento de novos níveis de energia produzidos entre o band gap do material (Figura 1) (ZALESKA, 2008).

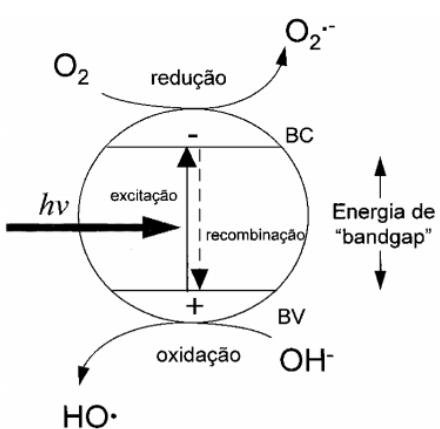


FIGURA 1. Mecanismo de fotocatálise de um semicondutor:  $h\nu$  (partícula pura).

Sendo assim, a dopagem afeta as propriedades ópticas do ZnO. Ullah et al (2008) testando a atividade fotocatalítica do ZnO dopado com manganês, usando como fonte de radiação luz UV e luz visível e, como contaminante teste o azul de metileno, observaram que há um aumento na intensidade de absorção na região do azul para as partículas dopadas, sugerindo que o sistema ZnO:Mn absorve mais luz visível, podendo ser usado como um eficiente fotocatalisador quando for irradiado por este tipo de luz. Entretanto, os autores assumiram que em altas concentrações o dopante pode reagir mais

com o oxigênio e formar  $MnO_x$  ao invés de ocorrer substituição intersticial no cristal de ZnO, anulando o efeito de deslocamento do band gap.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, F. C.; BARBANTE, C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, [S.l.], v. 86, p. 3-13, 2013.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control orel biofilm formation. **Jornal of Dental Research**, [S.l.], v. 89, p. 1175-1186, 2010.
- ALIPPI, A.M.; LÓPEZ, A. C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 94, p.487, 2010.
- ALIVISATOS, A. P. Nanocrystals: building blocks for modern materials design. **Endeavor**, [S.l.], v. 21, p. 56-60, 1997.
- AMARAL, A. L.; DAL SOGLIO, F. K.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to Phaeosphaeria Leaf Spot of Maize in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 8, p. 44-49, 2005.
- AMARAL, A. L.; DE CARLI, M. L.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brasil. **Plant Pathology**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 53, p. 259, 2004.
- ANJOS, M. A.; TAVARES, E. T. T.; OLIVEIRA, L. M.; MENDES, A. S. **Pequeno Glossário de Nanotecnologia**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, Coordenação Geral de Micro e Nanotecnologias, Set. 2006.
- AZAD, H.R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leafblotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* e *Pantoea stewartii*. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 54, p. 973-979, 2000. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS.2000.84.9.973>>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- BACILIO-JIMENEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M. V.; PEREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bactéria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasiliense*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, NY, US, v. 33, p. 167-172, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00126-7)
- BAHNEMANN, D. W.; KORMANN, C.; HOFFMANN, M. R. Preparation and characterization of quantum size zinc-oxide – a detailed spectroscopic study. **Journal of Physical Chemistry**, Easton, v. 91, p. 3789-3798, 1987. <https://doi.org/10.1021/j100298a015>
- BHATTACHARYYA, D.; SINGH, S.; SATNALIKA, N.; KHANDELWALI, A.; JEON, SH. Nanotechnology, Big things from a Tiny World: a Review. **International Journal of u- and e-Service, Science and Technology**, [S.l.], v. 2, p. 29-38, 2009.
- BRASIL. Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 200 p.

BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, J. R. N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p.1-6, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000100010>

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de espécies cultivadas.** 6. ed. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.

BUYER, J. S.; ROBERTS, D. P.; RUSSEK-COHEN, E. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v. 45, p. 138-144, 1999. <https://doi.org/10.1139/w98-227>

CALLISTER, Jr., **Introdução da Ciência e Engenharia de Materiais**, New York, NY, 2002.

CARLI, M. L. **Aspectos Etiológicos e epidemiológicos do complexo mancha branca do milho.** 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CARSON, M. L. Inheritance of resistance to Phaeosphaeria leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis* in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 89, p. 986-988, 2005.

CARSON, M. L. Vulnerability of U. S. maize germ plasm to Phaeosphaeria leaf spot. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 83, p. 462-464, 1999.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa, 2006. (Circular Técnica, 83)

CERVELATTI, E. P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; TEIXEIRA, F. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of Phaeosphaeria leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, v.1, p. 30-37, 2002.

**COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB.** Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, v. 4 – Safra 2016/17 – Décimo segundo levantamento, Set. 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 22 Nov. 2017.

COSTA, V.R.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E. **Recomendações para o controle químico da mancha branca do milho.** Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 2011. (Circular Técnica, 167).

COSTA, D. M.; RATHNAYAKE, R. M. P. S.; DE COSTA, W. A. J. M.; KUMARI, W. M. D.; DISSANAYAKE, D. M. N. Variation of Phyllosphere Microflora of Different Rice Varieties in Sri Lanka and its Relationship to Leaf Anatomical and Physiological Characters. **Agronomy e Crop Science**, [S.I.], v. 192, p. 209-220, 2006.

COTHER, E. J.; REINKE, R.; MCKENZIE, C.; LANOISELET, V. M.; NOBLE, D. H. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australian Plant Pathology**, [S.l.], v. 33, p. 495-503, 2004. Disponível em:<<http://link.springer.com/article/10.1071%2FAP04053>>. Acesso em 11 de Nov. 2017.

CRUZ, I.; BIANCO, R. **Manejo de pragas na cultura de milho safrinha**. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6.; CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2.; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM DE GRÃOS DO MERCOSUL, 2., 2001, Londrina. Valorização da produção e conservação de grãos no Mercosul: resumos e palestras. Londrina: FAPEAGRO: IAPAR, 2001. p. 79-112.

DENTI, E. A.; REIS, E. M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do Planalto Médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 585-590, 2003.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000600001>

FANTIN, G. M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença de milho que vem aumentando sua importância. **O Biológico**, São Paulo, SP, v. 56, p. 39, 1994.

FERNANDES, F. T. Mancha por *Phaeosphaeria* em milho. In: Oliveira, E. e Martins, C. (eds). **Doenças em milho: molicutes, vírus, vetores, mancha foliar por Phaeosphaeria**. Brasília, DF, Embrapa informação tecnológica, 2004, p. 267-276.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2000. (Circular técnica, 26)

**FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – FIESP**. Safra mundial de milho 2017/18 – Quarto Levantamento do USDA, Ago. 2017. Disponível em:<[http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/boletim\\_milho\\_agosto2017/](http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/boletim_milho_agosto2017/)>. Acesso em 31 Ago. 2017.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. 1. ed. Funep: Jaboticabal SP, 2007. 576p.

FUKUI, H.; HORIE, M.; ENDOH, S.; KATO, H.; FUJITA, K.; NISHIO, K.; KOMABA, L. K.; MARU, J.; MIYAUHI, A.; NAKAMURA, A.; KINUGASA, S.; YOSHIDA, Y.; HAGIHARA, Y.; IWASHASHI, H. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, Irlanda, IE, v. 198, p. 29-37, 2012.

GITAITIS, R. D.; GAY, J. D. First report of a leaf blight seeds stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 81, p. 1096, 1997. Disponível em:<[http://www.researchgate.net/profile/Ronald\\_Gitaitis/publication/249302957\\_First\\_Report\\_of\\_a\\_Leaf\\_Blight\\_Seed\\_Stalk\\_Rot\\_and\\_Bulb\\_Decay\\_of\\_Onion\\_by\\_Pantoea\\_ananas\\_in\\_Georgia/links/0f31753a9e96f078c900000?origin=publication\\_detail](http://www.researchgate.net/profile/Ronald_Gitaitis/publication/249302957_First_Report_of_a_Leaf_Blight_Seed_Stalk_Rot_and_Bulb_Decay_of_Onion_by_Pantoea_ananas_in_Georgia/links/0f31753a9e96f078c900000?origin=publication_detail)>. Acesso em 07 Nov. 2017.

GITAITIS, R.; WALCOTT, R.; CULPEPPER, S.; SANDERS, H.; ZOLOBOWSKA, L.; LANGSTON, D. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. **Crop Protection**, Guildford, Inglaterra, GB, v. 21, p. 983-989, 2002.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydiz*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 209-215, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200017>

GONÇALVES, R. M.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PEDRO, E. S.; MEIRELLES, W. F.; LEITE JUNIOR, R. P.; SAUER, A. V.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Etiology of Phaeosphaeria leaf spot disease of maize. **Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 95, p. 559-569, 2013.

GONÇALVES, R. M.; MEIRELLES, W.F.; FIGUEIREDO, M. I.; BALBI-PEÑA, M. I.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *Digitaria horizontalis* and *D. insularis* as alternative hosts for *Pantoea ananatis* in brazilian maize fields. **Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 97, p. 177-181, 2015.

GOSZCZYNSKA, T.; BOTHA, W. J.; VENTER, S. N.; COUTINHO, T. A. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 91, p. 711-718, 2007.

GOSZCZYNSKA, T., MOLOTO, V.M., VENTER, S.N. AND COUTINHO T.A. Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa. **Seed Science & Technology**, Zurich, Suiça, CH, v. 34, p. 677-690, 2006.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 341 p. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=js3lpMiU-zUC&oi=fnd&pg=PP1&dq=GOTO,+M.+Fundamentals+of+bacterial+plant+pathology.&ots=S6TcgbEdls&sig=bquvCYJyOvl9BE1VOiaJSCvRVd4#v=onepage&q=GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology.&f=false>>. Acesso em: 06 Nov. 2017.

HABIBA, K.; MAKAROV, V. I.; WEINER, B. R.; MORELL, G. Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis. In: Waqar A, Ali N (editors). **Manufacturing Nanostructures**. 2014. Cap 10, p. 263-92.

HAJIPOUR, M. J.; FROMM, K. M.; ASHKARRAN, A. A.; ABERASTURI, D. J.; LARRAMENDI, I. R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W. J.; MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 10, p. 499-511, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>

HARIHARAN, C. Photocatalytic degradation of organic contaminants in water by ZnO nanoparticles: Revisted. **Applied Catalysis A: general**, Amsterdam, NL, v. 304, p. 55-61, 2006.

IIMURA, K.; HOSONO, A. Biochemical characteristics of *Enterobacter agglomerans* and related strains found in buckwheat seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 30, p. 243-253, 1996.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 92, p. 807-811, 2010.

KRUPPA, P. C. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* em sementes e no interior de frutos de tomateiro pelo uso de meios de cultura semi-seletivos**. 1993. 71f. Dissertação (M.S.) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1993. – UNESP.

KWON, J. Y.; LEE, S. Y.; KOEDRITH, P.; LEE, J.Y.; KIM, K-M; OH, J-M; YANG, S. I.; KIM, M-K; LEE, J. K.; JEONG, J.; MAENG, E. H.; LEE, B. J.; SEO, Y. R. Lack of genotoxic potential of ZnO nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* tests. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 761, p. 1-9, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.01.005>

KURBANOV, S. S.; PANIN, G. N.; KIM, T. W.; KANG, T. W. Luminescence of ZnO nanocrystals capped with an organic dye. **Optics Communications**, Amsterdam, NL, v. 276, p. 127-130, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.04.017>

LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARÃES, C. T. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with White Spot Disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brasil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, DE, v. 160, p. 441-448, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01924.x>

LIN, K. F.; CHENG, H. M.; HSU, H. C.; LIN, L. J.; HSIEH, W. F. Chemical Band gap variation of size-controlled ZnO quantum dots synthesized by sol-gel method. **Physics Letters**, Amsterdam, NL, v. 409, p. 208-211, 2005.

LIN, K. F.; CHENG, H. M.; HSU, H. C.; HSIEH, W. F. Band gap engineering and spatial confinement of optical phonon in ZnO quantum dots. **Applied Physics Letters**, New York, US, v. 88, p. 263117, 2006. <https://doi.org/10.1063/1.2218775>

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D.; MOTA, L. C. B. M.; MARTINS, O. M.; COELHO, L. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Tropical Plant Pathology**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0203-z>

MARTINS, A. A. **Hospedeiros alternativos de *Pantoea ananatis***. 2014. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, 2014.

MEDRANO, E. G.; BELL, A. A. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and ball roto f cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, Inglaterra, GB, v.102, p. 134-143, 2006.

MENDES, L. S. da.; TEBALDI, N. D.; *Pantoea ananatis*: Importância, isolamento, cultivo em meio de cultura, inoculação, sobrevivência, disseminação, penetração, colonização e controle para cultura do milho (*Zea mays* L). **Revisão Anual Patologia de Plantas**, v. 19, p. 386-399, 2011.

MEYER, K.; RAJANAHALLI, P.; AHAMED, M.; ROWE, J. J.; HONG, Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. **Toxicology In Vitro**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 25, p. 1721-1726, 2011.

MONTALTI, M.; PRODI, L.; RAMPAZZO, E.; ZACCHERONI, N. Dye-doped sílica nanoparticles as luminescente organized systems for nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, London, GB, v. 43, p. 4243-4268, 2014.

MÔRO, G. V.; FRITSCHE NETO, R. **Importância e usos do milho no Brasil**. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (eds). Milho do plantio a colheita. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 09-25.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J. B., RAMIREZ, J. T., YACA- MAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, Inglaterra, GB, v. 16, p. 2346–2353, 2005.

National Nanotechnology Initiative (NNI): **Nanotechnology 101**. Estados Unidos. Acesso em Novembro de 2017, disponível em: <https://www.nano.gov//nanotech-101>.

NELSON, E. B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review phytopathology**, [S.l.], v. 42, p. 271-309, 2004.

NOGUEIRA, N. A. S. **Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> produzidas via método sol-gel protéico**. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

NORMANDER, B.; PROSSER, J. I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. **Applied Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 66, p. 4372-4377, 2000.

OLIVEIRA, J. R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. 1998. 98 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

PACCOLA-MEIRELLES L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detections of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brasil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, DE, v. 149, p. 275-279, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>

PACCOLA-MEIRELLES L. D.; MEIRELLES, W. F.; CERVELATTI, E. P.; MAKI, C. S.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; FERREIRA, A. S. Caracterização morfológica das lesões da mancha foliar por *Phaeosphaeria* em híbridos de milho e avaliação da incidência do estádio sexuado e assexuado do patógeno. **XXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 1998.

PACCOLA-MEIRELLES L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from Phaeosphaeria leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 2, p. 587-590, 2002.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Mancha Branca X *Pantoea ananatis*. In: Congresso nacional de milho e sorgo: Workshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho, 27, 2008, Londrina, Anais... Londrina, 2008. CD ROM.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2006. (Circular Técnica, 75)

PAN, B.; XING, B. S. Adsorption Mechanisms of Organic Chemicals on Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**, Easton, Pa., US, v. 42, p. 9005-9013, 2008.

PEARTON, S. J.; NORTON, D. P.; HEO, Y. W.; STEINER, T. Recent advances in processing of ZnO. **Journal Vac. Science Technology B**, [S.l.], v. 22, p. 3, 2004.

PEDRO, E.S.; GONÇALVES, R.M.; MEIRELLES, W.F.; REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Avaliação de diferentes produtos no controle da mancha branca do milho**. In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Goiânia, 2010.

PÉREZ-Y-TERRÓN, R.; VILLEGAS, M. C.; CUELLAR, B. A.; MUÑOZ-ROJAS, J.; CASTAÑEDA-LUCIO, M.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; BAUTISTA-SOSA, L.; MUNIVE, J. A.; CAICEDO-RIVAS, R.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. **Australian Plant Disease Notes**, Saint Paul, Minn., US, v. 4, p. 96-99, 2009.

PINTO, K. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicações de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak e Renfro. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 23, p. 1769-1778, 1999.

RANE, M. S.; PAYAK, M. M.; RENFRO, B. L. A. Phaeosphaeria leaf spot of maize. **Indian Phytopathology bulletin**, [S.l.], v. 3, p. 8-10, 1966.

RASMUSSEN, J. W.; MARTINEZ, E.; LOUKA, P.; WINGETT, D. G. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v. 7, p. 1063–1077, 2010.

<https://doi.org/10.1517/17425247.2010.502560>

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v. 53, p. 802-808, 2007. <https://doi.org/10.1139/W07-048>

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

SALAMANCA-BUENTELLO, F.; PERSAD, D. L.; COURT, E. B.; MARTIN, D. K.; DAAR, A. S.; SINGER, P. A. Nanotechnology and the developing world. **PLoS Medicine**, San Francisco, CA, v. 2, p. 383-386, 2005.

SAWAI, J.; KAWADA, E.; KANOU, F.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, A.; KOKUGAN, T.; SHIMIZU, M. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. **Journal of chemical engineering of Japan**, Tokyo, JP, v. 29, p. 627-633, 1996 (A).

SAWAI, J.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, A.; KOKUGAN, T.; SHIMIZU, M. Effect of Particle Size and Heating Temperature of Ceramic Powders on Antibacterial Activity of Their Slurry. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Tokyo, JP, v. 29, p. 288-93, 1996 (B).

<https://doi.org/10.1252/jcej.29.251>

SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GALVÃO, J. C. C.; CASTRO, J. L.; PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 585-589, jun. 1997.

SAUER, A. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; BABA, V. Y.; PEDRO, E. S.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Sobrevivência de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em restos culturais de milho.** XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, At Associação Brasileira de Milho e Sorgo, Goiania-Go, Brazil, Volume: CD-Rom. 2010.

SCHAAD, N. W.; DONALDSON, R. C. Comparison of two methods for detection of in infected crucifer seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, Suiça, CH, v. 8, p. 383-392, 1980

SCHAAD, N. W.; FORSTER, R. A. Semi-selective agar médium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. **Seed Science & Technology**, Zurich, Suiça, CH, v. 8, p. 383-391, 1982.

SHARMA, V.; ANDERSON, D.; DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis**, London, v. 17, p. 852-870, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0705-6>

SHI, H.; LIU, X.; ZHANG, Y. Fabrication of novel antimicrobial poly(vinyl chloride) plastic for automobile interior applications. **Iranian Polymer Journal**, [S.I.], v. 23, p. 297-305, 2014.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. O.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre as sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 587-593, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582002000600005>

SILVA, F. O.; VIOL, L. C. S.; FERREIRA, D. L.; ALVES, J. L. A.; SCHIAVON, M. A. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 33, p. 1933-1939, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900021>

SIMON, H. M.; SMITH, K. P.; DODSWORTH, J. A.; GUENTHNER, B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacterial in the spermosphere. **Applied Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 67, p. 514-520, 2001.

SINGH, P.; NANDA, A. Enhanced sun protection of nano-sized metal oxide particles over conventional metal oxide particles: an *in vitro* comparative study. **International Journal of Cosmetic Science**, London, GB, v. 36, p. 273-283, 2014. <https://doi.org/10.1111/ics.12124>

SOARES, J. Desenvolvimento de meio semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SOZER, N. KOKINI, J. L. Nanotechnoloogy and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 27, p. 82-89, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>

STROYUK, A. L.; KRYUKOV, A. I.; KUCHMII, S. Y.; POKHODENKO, V. D. Quantum size effects in semiconductor photocatalysis. **Theoretical and Experimental Chemistry**, [S.l.], v. 41, 2005.

TABEI, H.; AZEGAMI, K.; FVKUDA, T. Infection site of rice grain with *Erwinia herbicola*, the causal agente of bacterial palea browning of rice. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, [S.l.], v. 54, p. 637, 1988.

TAYLOR, J. D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 66, p. 29-39, 1970.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1970.tb04599.x>

ULLAH, R.; DUTTA, J. Photocatalytic Degradation of Organic Dyes with Manganese Doped ZnO Nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, NL, v. 156, p. 194-200, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.033>

VALARINI, P. J.; SPADOTTO, C. A. Identificação de fitopatógenos em áreas irrigadas de Guaíra, SP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, RJ, v. 30, p. 1239-1243, 1995.

VIEIRA, R. A.; TESSMANN, D.; SCAPIM, C. A.; HATA, F. T.; RODOVALHO, M. A.; BARRETO, R. R. Genetic resistance of new popcorn hybrids to foliar diseases. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 9, p. 140-146, 2009.

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, p. 268-270, 2016.

Von MOOS, N.; SLAVEYKOVA, V. I. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bactéria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. **Nanotoxicology**, London, v. 8, p. 605-630, 2014. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C.; SANDERS JÚNIOR, F. H.; DIAZ-PEREZ, J. C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agente of center rot. **Plant Disease**, Saint Paul, Minn., US, v. 86, p. 106-111, 2002.

WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, NL, v. 39, p. 968-984, 2015. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>

WANG, B.; ZHANG, Y.; MAO, Z.; YU, D.; GAO, C. Toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages due to cell uptake and intracellular release of zinc ions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, Calif., US, v. 14, p. 5688-5696, 2014.

WATANABE, K.; KAWAKITA, H.; SATO, M. Epiphytic bacterium, *Erwinia ananas*, commonly isolated from rice plants and brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*) in hopperburn patches. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, JP, v. 31, p. 459-462, 1996.

<https://doi.org/10.1303/aez.31.459>

WELLS, J. M.; SHENG, W. S.; CEPONIS, M. J.; CHEN, T. A. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 77, p. 511-514, 1987.

**WICHLAB**, Disponível em <<http://www.wichlab.com/research/>>. Acesso em: 08 nov. 2017.

WILLANDER, M.; KHUN, K.; IBUPOTO, Z. H. ZnO based potentiometric and amperometric nanosensors. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, Calif., US, v. 14, p. 6497-6508, 2014.

YAMADA, T. Nutrição fosfatada melhora a resistência da planta às doenças. **Informações agronômicas**, Piracicaba, SP, v. 97, p. 26-27, 2002.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **Internacional Journal of Inorganic Materials**, [S.I.], v. 3, p. 643-646, 2001.

YANG, H.; LIU, C.; YANG, D.; ZHANG, H.; XI, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, Inglaterra, v. 29, p. 69-78, 2009.

ZACHOWSKI, M. A.; RUDOLPH, K. Characterization of isolates of bacterial blight of cotton (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) from Nicaragua. **Journal of Phytopathology**, Berlin, DE, v. 123, p. 344-352, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1988.tb04486.x>

ZALESKA, A. Doped-TiO<sub>2</sub>: A Review. **Recent Patents on Engineering**, [S.I.], v. 2, p. 157-164, 2008.

ZHANG, L. L.; JIANG, Y. H.; DING, Y. L.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, [S.I.], v. 9, p. 479-489, 2007.

ZHANG, Y.; NAYAK, T. R.; HONG, H.; CAI, W. Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials. **Current molecular medicine**, [S.I.], v. 13, p. 1633-1645, 2013

ZHANG, M.; NA, T.; HU, X.; WANG, C.; SHENG, G.; FU, J. Preparation and photocatalytic properties of a nanometer ZnO-SnO<sub>2</sub> coupled oxide. **Applied Catalysis A: General**, Amsterdam, NL, v. 260, p. 215-222, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2003.10.025>

## CAPÍTULO 1. DETECCÃO DE *Pantoea ananatis* EM SEMENTES DE MILHO

### RESUMO

A cultura milho (*Zea mays* L.) no Brasil está sujeita a ocorrência de várias doenças, entre elas a mancha branca, causada pela bactéria *Pantoea ananatis*. A detecção e a transmissão da bactéria já foi descrita em sementes de cebola. Recentemente, detectou-se a bactéria em sementes de milho. Diante disso, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar meios de cultura semi-seletivos para detecção de *P. ananatis*; (ii) detectar a presença de *P. ananatis* em sementes de oito genótipos de milho; (iii) identificar e caracterizar bioquímica e molecularmente os isolados bacterianos. Para avaliação dos meios de cultura, foram utilizados dois isolados de *P. ananatis* em cinco meios de cultura (523, NA, TSA, PA10 e PA20) com ausência ou presença dos fungicidas ciclohexamida e tiofanato metílico, com três repetições cada. A eficiência de cada meio de cultura foi determinada a partir do diâmetro das colônias e contagem do número de colônias em UFC mL<sup>-1</sup>. Para detecção da bactéria nas sementes foram utilizados oito genótipos de milho, plaqueados em três meios de cultura (523, NA e TSA) com três repetições para cada diluição. Os isolados obtidos foram caracterizados bioquímica, fisiologicamente e molecularmente. Os meios de cultura TSA e 523 com adição de ciclohexamida foram eficazes para a detecção de *P. ananatis*. A bactéria foi detectada em sementes de cinco genótipos de milho. O meio de cultura TSA com adição de ciclohexamida pode ser recomendado para a detecção de *P. ananatis* em sementes de milho.

Palavras-chave: Etiologia; *Zea mays*; Mancha branca.

## ABSTRACT

The corn (*Zea mays* L.) non-Brazil crop is subject to the occurrence of several diseases, including white spot, caused by the bacterium *Pantoea ananatis*. A description and transmission of the bacteria have already been described in onion seeds. Recently, detect a bacterium in corn seeds. The objective of this work was to: (i) evaluate semi-selective culture media for the detection of *P. ananatis*; (ii) detect a presence of *P. ananatis* in seeds of eight maize genotypes; (iii) identify and characterize biochemical and molecularly bacterial isolates. To evaluate the culture media, two isolates of *P. ananatis* were used in five culture mediums (523, NA, TSA, PA10 and PA20) with absence or presence of fungicides cyclohexamide and methyl thiophanate, with three replicates each. The efficiency of each culture medium was determined from the time of the colonies and counting of the number of colonies in CFU mL<sup>-1</sup>. For the detection of the bacterium in the seeds were used with the three maize genuses, plated in three media (523, NA and TSA) with three replicates for each dilution. The obtained isolates were characterized biochemically, physiologically and molecularly. TSA and 523 culture media with addition of cyclohexamide were effective for detection of *P. ananatis*. The bacterium was detected in seeds of five maize genotypes. TSA culture medium with addition of cyclohexamide may be recommended for detection of *P. ananatis* in corn seeds.

Key-words: Etiology; *Zea mays*; White spot.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays L.*) no Brasil está sujeita a ocorrência de várias doenças, entre elas a mancha branca, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001), que possui ampla distribuição geográfica acarretando em perdas superiores a 60% na produção (PINTO, 1999; CASELA et al., 2006).

Presente no país desde a década de 1980, a doença inicia-se com o aparecimento de lesões foliares aquosas do tipo anasarca, com coloração verde-escuro que evoluem para necróticas e de cor palha. Os plantios tardios de milho favorecem condições ambientais para o rápido desenvolvimento da doença, entre estas, temperatura moderada e alta umidade relativa do ar (COSTA et al., 2010).

A bactéria sobrevive epifiticamente sobre as folhas de milho, assim como nos restos culturais (SAUER et al., 2010) e em hospedeiros alternativos, como sorgo, capim colchão, planta infestante muito comum em lavouras de milho (LANA et al., 2012), capim carrapicho e caruru (MARTINS, 2014), sendo assim fonte de inóculo da bactéria no campo.

O manejo da doença pode ocorrer pelo cultivo de genótipos resistentes, pela aplicação de fungicidas (PEDRO et al., 2010) que, no entanto, não é eficiente (ROMEIRO, 2005) e também por meio do uso de sementes livres do patógeno, para evitar a disseminação e introdução da bactéria em área de cultivo. Nesse sentido, a busca por alternativas de avaliação da qualidade de sementes torna-se constante, já que se trata de um recurso que pode auxiliar o produtor na escolha deste insumo.

A qualidade sanitária das sementes pode ser comprovada pelo uso de meios de cultura semi-seletivos que ofereçam alta sensibilidade, confiabilidade e rapidez dos resultados (VIOLATTI e TEBALDI, 2016). Tais meios de cultura podem ser empregados para suprimir ou prevenir o crescimento de um grupo de organismos, ao mesmo tempo em que permite o crescimento de outro grupo, quando presentes na mesma microflora (KLEMENT et al., 1990). Desse modo, os meios semi-seletivos são alternativa possível de adoção em nível de rotina pelos laboratórios de sanidade de sementes no Brasil.

A detecção e a transmissão da bactéria já foi descrita em sementes de cebola (GOSZCZYNSKA et.al., 2006a). Recentemente, Mamede et al. (2018) detectou a bactéria em sementes de milho, utilizando meio de cultura semi-seletivo (PA 20), com adição de tiofanato metílico.

Diante disso, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar meio de cultura semi-seletivo para detecção de *P. ananatis*; (ii) detectar a presença de *P. ananatis* em sementes de oito genótipos de milho; (iii) identificar e caracterizar bioquímica e molecularmente os isolados bacterianos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia.

### **2.1. Preparo da suspensão bacteriana**

O isolado bacteriano UFU B13, de *Pantoea ananatis* pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU foi recuperado e multiplicado em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C.

A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada autoclavada, ajustada em espectrofotômetro para OD<sub>550</sub> 0,1 correspondendo aproximadamente a 1x10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

### **2.2 Meios de cultura para detecção de *Pantoea ananatis***

O experimento foi realizado em esquema fatorial (1 isolados x 5 meios de cultura x 3 ausência ou presença de 2 fungicidas), com três repetições.

A suspensão bacteriana dos isolados foi diluída em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) e cultivada sobre cinco meios de cultura: 523, NA, PA20, PA20 modificado (diferindo de PA20 pela redução de NaCl) e TSA. Com e sem adição dos fungicidas tiofanato metílico 0,04 mg mL<sup>-1</sup> (BOMFETI et al., 2007) ou de ciclohexamida 0,005 mg mL<sup>-1</sup> (SAUER et al., 2010). As placas foram incubadas em BOD a 28°C por até dez dias.

A eficiência de cada meio de cultura foi determinada a partir do diâmetro das colônias e contagem do número de colônias em UFC mL<sup>-1</sup>. Já as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

### **2.3 Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho**

Para a detecção da bactéria *Pantoea ananatis* foram avaliados oito genótipos de sementes de milho: ADV 9339; ADV 9275 Pro; ADV 9860 Pro; Morgan MG 600 PW; 30F53HY; 30A37PW e dois genótipos codificados de Formosa (GO). Todos os genótipos foram colhidos de plantas que apresentavam sintomas de mancha branca.

Em Erlenmeyer foram adicionados 100g de sementes e 200 mL de água filtrada e autoclavada, incubados na geladeira por 16 horas. Os extratos de sementes foram diluídos em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-2</sup>) e cultivados nos meios de cultura 523, NA e TSA com adição de ciclohexamida, em placas de Petri,

com três repetições para cada diluição. As placas foram incubadas a 28º C por 4 dias, calculando-se o número de UFC g<sup>-1</sup> de sementes.

O ensaio foi realizado em esquema fatorial 3 x 8 (meios de cultura x genótipos) em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de cada amostra.

As colônias suspeitas foram repicadas e cultivadas para o meio 523 e caracterizadas bioquímica e fisiologicamente pelos testes de: Gram, Oxidação/Fermentação, YDC, motilidade, produção de ácidos a partir da glicose de inositol, sorbitol, sacarose e D-arabinose, pela produção das enzimas arginina dihidrolase, liquefação da gelatina, oxidase, catalase e crescimento a 37 ºC. Reação de hipersensibilidade e patogenicidade no hospedeiro. A caracterização molecular foi realizada utilizando um par de *primers* específicos para *Pantoea ananatis*.

### **2.3.1 Teste de patogenicidade no hospedeiro**

Plantas de milho da cultivar Morgan MG 600 PW foram cultivadas em vasos plásticos de 500 g contendo substrato, solo, areia grossa e vermiculita na proporção de 3:1:1, com 2 plantas por vaso. Aproximadamente 10 dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam de 3 a 4 folhas, com auxílio de uma tesoura, realizou-se inoculação da suspensão bacteriana. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação.

A partir do aparecimento dos sintomas (lesões encharcadas progredindo para necrose do tecido) foi realizado reisolamento da bactéria.

### **2.3.2 Caracterização molecular, reação em cadeia da polimerase**

Dez isolados bacterianos obtidos na detecção em sementes, com características bioquímicas de *P. ananatis*, foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Para confirmar a identidade dos isolados bacterianos foi usado o par de *primers* específico para *P. ananatis* ANAF: (5'-CGTGAAACTACCCGTGTCTGTTGC-3') e ANAR: (5'-TGCCAGGGCATCCACCGTGTACGCT-3') (FIGUEIREDO; PACCOLA-MEIRELLES, 2012).

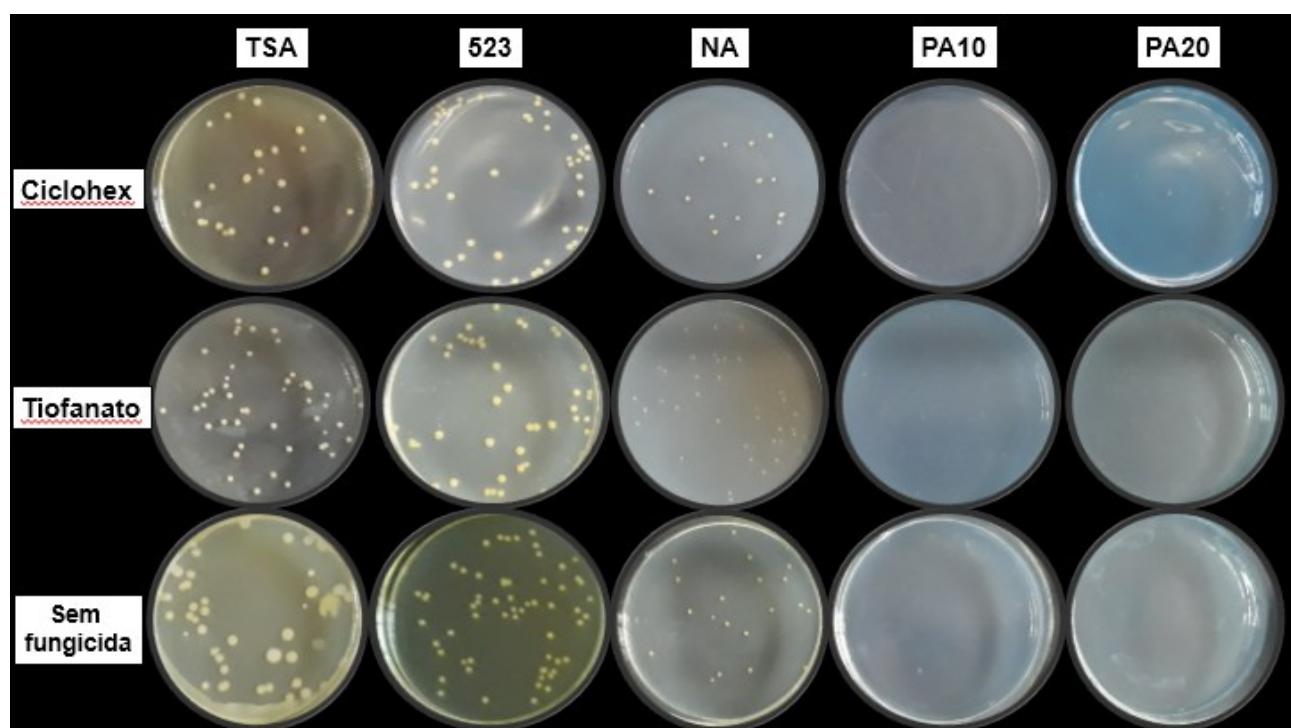
O DNA foi extraído usando o Kit- PROMEGA (Wizard Genomic DNA Purification Kit) e quantificado no Thermo Scientific™ Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer. As reações de PCR foram realizadas na concentração e no volume final de 12,5 µL de reação. Já a reação de amplificação foi realizada em termociclador ThermoHybaid: Omn-E com as seguintes condições: um ciclo para desnaturação do DNA a 94 ºC por 1 min, 30 ciclos de 1 min a 94 ºC, 1 min a 68 ºC (anelamento) e 1 min a 72 ºC (extensão), e um ciclo final a 10 min a 72ºC.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com SYBR Safe, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Meios de cultura para detecção de *Pantoea ananatis*

No quarto dia após o cultivo da bactéria, os meios de cultura TSA e 523 apresentaram colônias com maior diâmetro (Tabela 1), com e sem a adição de fungicidas (Figura 1). No meio TSA, sem adição de fungicidas (4,93), o diâmetro das colônias foi o de maior destaque. Quando houve adição de ciclohexamida, não houve diferença significativa entre os meios 523 (2,90) e TSA (3,10). No entanto, com a adição de tiofanato metílico o diâmetro das colônias foi maior no meio 532 (3,00) comparado ao TSA (2,15). Nos meios PA 10 e PA 20, sem e com adição de fungicidas, não foi possível a detecção da bactéria. A adição de fungicidas aos meios 523 e TSA, aumentaram e diminuiram o diâmetro das colônias, respectivamente.



**FIGURA 1.** *Pantoea ananatis* nos meios de cultura TSA, 523, NA, PA10 e PA20 com adição de ciclohexamida; com adição de tiofanato metílico e sem fungicida.

**TABELA 1.** Diâmetro (mm) das colônias de *Pantoea ananatis* em diferentes meios de cultura, com e sem a adição de fungicidas. Uberlândia – MG.

Meio de cultura	Sem fungicida	Ciclohexamida	Tiofanato metílico
PA10	0,00 Ad	0,00 Ac	0,00 Ad
PA20	0,00 Ad	0,00 Ac	0,00 Ad
NA	1,02 Ac	1,00 Ab	1,02 Ac
523	1,96 Bb	2,90 Aa	3,00 Aa
TSA	4,93 Aa	3,10 Ba	2,15 Cb
<b>CV%</b>	<b>6,49</b>		

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05.

O uso de fungicidas associado aos meios de cultura, além de reduzir o número de microrganismos contaminantes, também pode favorecer o desenvolvimento da espécie desejada (ROUMAGNAC, 2000). Este foi um fato constatado nas experimentações, pois no meio de cultura 523, a adição dos fungicidas levou ao aumento no tamanho das colônias e no caso do meio TSA os fungicidas reduziram significativamente (Tabela 1) o diâmetro da colônia, porém sem prejuízo a sua visualização.

Na produção de um meio semi-seletivo, a ausência de repressividade (ou repressividade muito baixa) e supressividade elevada são características muito vantajosas. Contudo, isso, quase sempre, não é alcançado (LOPES et al., 2008). Ainda que sejam escolhidos apenas agentes de seletividade que não prejudiquem os microrganismos alvos, a mistura destes ao meio de cultura pode causar efeito negativo. Tal fato também foi observado por Toussaint et al. (2001), que na recuperação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vitians*, observaram crescimento menor no meio seletivo desenvolvido (MMG) quando comparado a um meio não seletivo.

Entretanto, cabe salientar que em meio não-seletivo a identificação e quantificação da bactéria alvo seria extremamente dificultada devido ao grande número de microrganismos saprófitos, os quais possuem desenvolvimento mais rápido que o organismo de interesse.

Na avaliação de um meio de cultura semi-seletivo, os principais critérios são a seletividade e a eficiência na detecção de patógenos, com alta supressividade para microrganismos saprófitas e baixa repressividade para bactérias fitopatogênicas que se deseja detectar e/ou quantificar (LOPES et. al., 2008). A alta seletividade do meio de cultura minimiza problemas de contaminação por outros organismos, assim como restringe os problemas advindos do fato dos saprófitas crescerem mais rápido e inibirem o crescimento da bactéria alvo, o que leva ao crescimento mais lento desta (MOURA; ROMEIRO, 1993).

Segundo Schaad (1989) a utilização de meios semi-seletivos é a melhor metodologia para identificação de bactérias em sementes. Entretanto, a inclusão de compostos antibióticos e antifúngicos ao meio básico para a inibição de saprófitas deve ser estudada cuidadosamente, visto que a mínima sensibilidade a estes compostos pode prejudicar a recuperação das bactérias alvo nas sementes (RANDHAWA e SCHAAD, 1983).

Neste estudo, os meios semi-seletivos PA 20 e PA 10 (PA 20 modificado) exibiram colônias apenas 10 dias após a realização do ensaio. Diante disso, estes meios de cultura não são recomendados para a detecção de bactérias em sementes, já que busca-se métodos que apresentem sensibilidade, especificidade, precisão e rapidez nos resultados (DENARDIM et. al., 2004).

Para o número de colônias desenvolvidas, aos quatro dias, nos meios de cultura 523 e TSA (Tabela 2) não houve diferença significativa. O meio NA não diferiu significativamente do meio 523. No entanto, para os meios PA 10 e PA 20 não houve detecção da bactéria. A presença dos fungicidas ciclohexamida e tiofanato metílico (Tabela 3) não diferiram significativamente entre si no crescimento da bactéria, ou seja, o uso destes fungicidas não inibiu o crescimento bacteriano. Portanto, estes fungicidas podem ser incorporados aos meios de cultura para facilitar a detecção da bactéria alvo e inibir o crescimento de microrganismos saprófitas.

**TABELA 2.** Detecção de *Pantoea ananatis* em diferentes meios de cultura, em unidades formadoras de colônia. Uberlândia – MG.

Meio de cultura	UFC mL <sup>-1</sup>
PA10	0,00 c
PA20	0,00 c
NA	3,4 x 10 <sup>9</sup> b
523	4,5 x 10 <sup>9</sup> ab
TSA	5,2 x 10 <sup>9</sup> a
CV%	38,55

Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 0,05.

**TABELA 3.** Detecção de *Pantoea ananatis* na presença e ausência de fungicidas, em unidades formadoras de colônia. Uberlândia – MG.

Tratamento	UFC mL <sup>-1</sup>
Sem fungicida	2,1 x 10 <sup>9</sup> b
Ciclohexamida	2,7 x 10 <sup>9</sup> ab
Tiofanato metílico	3,0 x 10 <sup>9</sup> a
CV%	38,55

Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 0,05.

Nos meios PA 20 e PA 10 o crescimento da bactéria foi observado somente no décimo dia após o cultivo, com colônias menores que 1mm. Mamede et al. (2018) observaram que no meio semi-seletivo PA20 houve redução no diâmetro das colônias quando comparado ao meio 523. Esse comportamento, de acordo com Goszczynska et al. (2006b), deve-se a redução do pH promovida pela degradação da única fonte de carbono, D (+) arabitol, para ácido.

A seletividade dos meios de cultura semi-seletivos pode ser obtida através de fontes específicas de carbono e nitrogênio, as quais buscam estimular o crescimento de uma determinada espécie e inibir outra. A adição de substâncias tóxicas visa reduzir o número de contaminantes e favorecer o desenvolvimento da espécie desejada (McGUIRE et. al., 1986).

Violatti e Tebaldi (2016), avaliando colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* no meio semi-seletivo MXG, independente do uso ou não de antibióticos, observaram redução visual significativa no diâmetro das colônias. Também na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* em videira foi observado que o meio semi-seletivo CCM reduziu o tamanho das colônias (PEIXOTO et. al., 2006).

Embora não houvesse crescimento de microrganismos oportunistas nos meios de cultura PA10 e PA20, mesmo sem a adição dos fungicidas, o crescimento da bactéria alvo foi prejudicado. A diminuição do tamanho das colônias, bem como a demora em seu crescimento podem ter relação com a presença de NaCl (cloreto de sódio), considerado uma substância inibidora. Tortora et al. (2017) descrevem que altas concentrações de NaCl tornam o ambiente hipertônico, o que leva a perda de água da célula com consequente entrave do crescimento da bactéria.

Dessa forma, verificou-se que os meios TSA e 523, com adição de ciclohexamida ou tiofanato metílico, podem ser recomendados para a detecção da bactéria em análise de rotina em laboratório, já que apresentaram alta eficiência no crescimento de *P. ananatis* e índice de supressividade satisfatório.

### **3.2 Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho**

A bactéria foi detectada nas sementes de cinco dos oitos genótipos avaliados (Tabela 4). Nos meios de cultura 523, NA e TSA a bactéria foi detectada nos genótipos ADV 9860 Pro e Genótipo 2. Para o meio de cultura NA a bactéria foi detectada no genótipo ADV 9275 Pro. E para o meio de cultura TSA a bactéria foi detectada nas sementes do genótipo 30A37PW e Genótipo 1. Destacando que o maior número de UFC g de semente<sup>-1</sup> foi detectado no meio de cultura TSA.

**TABELA 4.** Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de diferentes genótipos de milho , nos meios de cultura 523, NA e TSA, com adição de ciclohexamida. Uberlândia – MG.

Genótipos	Meios de cultura (UFC g de semente <sup>-1</sup> )		
	523	NA	TSA
ADV 9339	0,00	0,00	0,00
ADV 9275 Pro	0,00	6,67	0,00
ADV 9860 Pro	20,00	48,89	162,22
Morgan MG 600 PW	0,00	0,00	0,00
30F53HY	0,00	0,00	0,00
30A37PW	0,00	0,00	666,67
Genótipo 1	4,44	0,00	24,44
Genótipo 2	133,33	222,22	151,11

A alta taxa de recuperação observada nas amostras de sementes reflete a baixa repressividade dos meios semi-seletivos desenvolvidos (523, NA e TSA com adição de ciclohexamida). Resultados semelhantes foram observados na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de brócolis (TEBALDI, et al., 2007), detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro (MARINGONI et al., 2006), na recuperação de *Burkholderia glumae* em sementes de arroz (KAWARADANI et al., 2000), na detecção de *Xanthomonas campestris* em sementes de girassol (ROMEIRO et al., 1998), na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (ROMEIRO et al., 1993), na detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino (MOURA e ROMEIRO., 1993), na recuperação de *Xanthomonas* spp. em sementes de arroz (MING et al., 1991), na recuperação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomate (FATMI e SCHAAD, 1988) e na recuperação de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em sementes de feijoeiro (MOHAN e SCHAAD, 1987).

Apesar dos lotes de sementes serem coletados de áreas com histórico de mancha branca nos genótipos ADV 9339, Morgan MG 600 PW e 30F53HY, não houve a detecção de *Pantoea ananatis*. De acordo com Prathuangwong e Khandej (1998), ao realizar inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* em plantas de soja, verificaram que a gravidade da pústula bacteriana na folhagem de soja correlacionou-se com a porcentagem de infecção observada em suas sementes. A medida em que a severidade da doença aumentava, a proporção de sementes infectadas também aumentou. Dessa forma, a detecção de bactérias em sementes pode estar ligada a severidade da doença no campo e o nível de inóculo presente nas sementes.

Dez isolados bacterianos detectados nas sementes de milho foram caracterizados como: Gram negativos, fermentação da glicose, colônias amarelas em meio YDC, oxidase negativa, catalase, arginina dihidrolase, produção de ácidos a partir do inositol, sorbitol, sacarose, D-arabinose positivo, motilidade positivo, liquefação da gelatina positivo, crescimento a 37°C positivo e reação de hipersensibilidade em fumo positivo.

Os dez isolados bacterianos obtidos das sementes foram patogênicos em plantas de milho (Tabela 5), sendo que no segundo dia após a inoculação foi possível observar a reprodução dos sintomas da mancha-branca em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação. A partir do aparecimento das lesões necróticas foi realizado o reisolamento da bactéria, confirmando os Postulados de Koch.

Os primers ANAF/ANAR, específicos para *P. ananatis*, confirmaram a identidade dos isolados bacterianos. Os produtos de PCR amplificados geraram um único fragmento de DNA de tamanho aproximado de 380 pb. Estes resultados encontram-se em concordância com Miller (2014), que identificou por PCR isolados bacterianos usando tais primers.

De acordo com os testes para caracterização bioquímica, fisiológica, morfológica, molecular, e patogenicidade no hospedeiro a bactéria foi identificada como *Pantoea ananatis*.

O uso de sementes de qualidade é uma das premissas para obtenção de elevadas produtividades na cultura do milho (MARTIN et al., 2007). Sementes de boa qualidade são aquelas que agregam os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, visto que tais características afetam sua capacidade de originar plantas e lavouras de alta produtividade (POPINIGIS, 1985).

Apesar da taxa de transmissão de bactérias por sementes ser baixa (SCHAAD, 1989), a utilização de sementes contaminadas pode resultar em plantas infectadas e na introdução precoce da doença em campos de produção, o que, sob condições favoráveis de temperatura e umidade, leva a rápida disseminação, causando sérios prejuízos as lavouras.

Tendo como base os resultados, pode-se concluir que a detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho com meios de cultura semi-seletivos associadas as técnicas de PCR são métodos eficazes de detecção e confirmação. Destacando que ainda são necessários estudos que busquem identificar a taxa de transmissão da bactéria pela semente.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os meios de cultura TSA e 523 com adição de ciclohexamida foram eficientes na detecção de *Pantoea ananatis*.

A bactéria *Pantoea ananatis* foi detectada em sementes de cinco genótipos de milho e identificada pelos testes bioquímicos e molecular.

O meio de cultura TSA com adição de ciclohexamida pode ser recomendado para a detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho, podendo ser usado em análises de rotina no laboratório.

## REFERÊNCIAS

- BOMFETI, C. A.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Avaliação de produtos químicos comerciais, *in vitro* e *in vivo*, no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 33, p. 63-67, 2007.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000100009>
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2006. (Circular Técnica, 83)
- COSTA, R. V. da; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). Cultivo do milho. 6. ed. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2010.
- DENARDIM, N. D.; MOURA, A. B.; MENTEN, J. O. M. Detecção e identificação de bactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, João Pessoa, In: **Anais...** SNA, 2004. p.62-67.
- FATMI, M.; SCHAAD, N. W. Semiselective agar médium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 121-126, 1988. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-121>
- FERREIRA, D. F. **Estatística multivariada**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. 662 p.
- FIGUEIREDO, J. E. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Simple, rapid and accurate PCR-based detection of *Pantoea ananatis* in maize, sorghum and *Digitaria* sp. **Journal Plant Pathology**, [S.l.], v. 94, p. 663- 667, 2012.
- GOSZCZYNSKA, T., MOLOTO, V.M., VENTER, S.N. AND COUTINHO T.A. Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South Africa. **Seed Science & Technology**, Zurich, Suiça, CH, v. 34, p. 677-690, 2006. (A)
- GOSZCZYNSKA, T., VENTER, S.N. AND COUTINHO T.A. PA 20, a semiselective medium for isolation and enumeration of *Pantoea ananatis*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, NL, v. 64, p. 225–231, 2006. (B) <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.05.004>
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 60, p. 969-976. 1970.
- KAWARADANI, M.; OKADA, K.; KUSAKARI, S. New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* from rice seeds. **Journal of General Plant Pathology**, Toquio, v. 66, p. 234-237, 2000.
- KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C. (Ed). **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.

LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; SOUZA, I. R. P.; GUIMARÃES, C. T. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with White Spot Disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brasil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, DE, v. 160, p. 441-448, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01924.x>

LOPES, L.P.; ALVES, P. F. R.; ZANDONÁ, C.; NUNES, M. P.; MEHT, Y. R. Meio semi-seletivo para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e sua erradicação através do tratamento de sementes com o fungicida tolylfluanid. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 287-288, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000300020>

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D.; MOTA, L. C. B. M.; MARTINS, O. M.; COELHO, L. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Tropical Plant Pathology**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0203-z>

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 451-455, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400009>

MARTIN, T. N.; TOMAZELLA, A. L.; CÍCERO, S. M.; DOURADO NETO, D.; FAVARIN, J. L.; VIEIRA JUNIOR, P. A. Questões relevantes na produção de sementes de milho – primeira parte. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, p. 119-138, 2007.

MARTINS, A. A. **Hospedeiros alternativos de Pantoea ananatis**. 2014. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, 2014.

McGUIRE, R. G.; JONES, J. B.; SASSER, M. Tween media for semi selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 887-891, 1986. <https://doi.org/10.1094/PD-70-887>

MING, D.; YE, H.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. Selective recovery of *Xanthomonas* spp. From rice seed. **Phytopathology**, Saint Pauls, v. 81, p. 1358-1363, 1991.

MOHAN, S. K.; SCHAAD, N. W. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.*pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 1390-1395, 1987. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1390>

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. Desenvolvimento de um meio semi seletivo para *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, p. 209-214, 1993. <https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v15n2p209-214>

MILLER, A.M. **Variabilidade genética e nucleação de gelo em isolados de Pantoea ananatis, agente causal da mancha branca do milho**. 2014. 73 f. Dissertação (mestrado em agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D., FERREIRA, A. S., MERELLES, W. F., MARIEL, I. E., CASELA, C. R. Detection of bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil.

**Journal of Phytopathology**, Berlin, DE, v.149, p. 275-279, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>

PEDRO, E.S.; GONÇALVES, R.M.; MEIRELLES, W.F.; REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Avaliação de diferentes produtos no controle da mancha branca do milho.** In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Goiânia, 2010.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 1317-1320, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000400045>

PINTO, K. F. J. A. Eficiência de doses e intervalos de aplicações de fungicidas no controle da mancha foliar do milho provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rane, Payak e Renfro. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 23, p. 1769-1778, 1999.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da sementes**. Brasília: AGIPLAN, 2 ed., 1985, 289 p.

PRATHUANGWONG, S.; KHANDEJ, K. An artificial inoculation method of soybean seed with *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* for inducing disease expression. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, [S.I.], v. 32, p. 84-89, 1998.

RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, P. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 268-272, 1983.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. S.; MOURA, A. B.; MONTEIRO, A. J. Abioassay for detection and quantification of *Xanthomonas campestris* in sunflower seeds. **Seeds Technology**, Lincoln, v. 20, p. 94-99, 1998.

ROMEIRO, R. S.; PERES, F.; OLIVEIRA, J. R.; DEL PELOSO, M. J. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro: quantificação e percentage de transmissão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, p. 1-5, 1993. <https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v15n1p1-5>

ROUMAGNAC, P.; GAGNEVIN, L. e PRUVOST, O. Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agente of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. European **Journal of Plant Pathology**, [S.I.], v. 106, p. 867-877, 2000.

SAUER, A.V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; BABA, V. Y.; PEDRO, E. S.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. **Sobrevivência de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em restos culturais de milho.** XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, At Associação Brasileira de Milho e Sorgo, Goiania-Go, Brazil, Volume: CD-Rom. 2010.

SCHAAD, N. W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. In: SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. Detection of bactéria in seed and other planting material. **APS Press**, St. Paul, 1989, p.68-75.

TEBALDI, N.D; PANIZZI, R. de C.; SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p. 416-418, 2007.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R. e CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 12 ed., 2017, 964 p.

TOUSSAINT, V.; MORRIS, C. E.; CARISSE, O. Anew semi-selective médium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agente of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 131-136, 2001. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.2.131>

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, p. 268-270, 2016.

## CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE *Pantoea ananatis* IN VITRO

### RESUMO

A Mancha Branca do Milho (MBM) causada pela bactéria *Pantoea ananatis* é uma das mais importantes doenças foliares da cultura do milho. Com o avanço da nanobiotecnologia, nanomateriais têm sido utilizados como agentes antimicrobianos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação bactericida *in vitro* de nanocristais de ZnO dopados com concentrações crescentes de cobre, ferro, manganês, níquel, ouro e prata no controle de *P. ananatis*. Para determinação da toxidez dos nanocristais à *P. ananatis* foram utilizados nanocristais de ZnO dopados com seis elementos: prata (Ag), níquel (Ni), ferro (Fe), ouro (Au), manganês (Mn) e cobre (Cu) em diferentes concentrações. A toxidez direta dos nanocristais foi avaliada através do halo de inibição do crescimento bacteriano em meio de cultura, em placa de Petri, incubadas em estufa a 28°C por 48 horas. O diâmetro do halo de inibição foi avaliado em centímetros. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (concentração do elemento x 5 diluições), com 3 repetições. A utilização de nanocristais de óxido de zinco (ZnO) não apresentou efeito bactericida para *P. ananatis*. Nanocristais de ZnO dopados com cobre, ferro, manganês, níquel, ouro e prata inibiram o crescimento de *P. ananatis* *in vitro*, tendo potencial de uso na agricultura no controle de fitobactérias.

Palavras-chave: Nanocristais; Mancha branca; Bactericida.

## **ABSTRACT**

The White Corn Spot (MBM) caused by the bacterium *Pantoea ananatis* is one of the most important foliar diseases of the maize crop. With the advancement of nanobiotechnology, nanomaterials have been used as antimicrobial agents. The present work aimed to evaluate the *in vitro* bactericidal action of ZnO nanocrystals doped with increasing concentrations of copper, iron, manganese, nickel, gold and silver in the control of *P. ananatis*. To determine the toxicity of the nanocrystals to *P. ananatis* were used ZnO nanocrystals doped with six elements: silver (Ag), nickel (Ni), iron (Fe), gold (Au), manganese (Mn) and copper (Cu) in different concentrations. The direct toxicity of the nanocrystals was evaluated through the halo of inhibition of bacterial growth in culture medium in Petri dishes incubated in an oven at 28 ° C for 48h. The diameter of the inhibition halo was evaluated in centimeters. The experiment was conducted in a factorial scheme (element concentration x 5 dilutions), with 3 replicates. The use of zinc oxide nanocrystals (ZnO) did not present bactericidal effect for *P. ananatis*. ZnO nanocrystals doped with copper, iron, manganese, nickel, gold and silver inhibited the growth of *P. ananatis* *in vitro*, with potential for use in agriculture in the control of phytobacteria.

Key-words: Nanocrystals, White spot, Bactericidal.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o milho (*Zea mays* L.) representa a segunda espécie vegetal mais cultivada, ficando atrás apenas da soja (MÔRO e FRITSCHE NETO, 2015). Em 2017, a cultura alcançou uma produção de 97,71 milhões de toneladas distribuídas entre a primeira safra de 30,46 milhões de toneladas e a segunda safra de 67,25 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

As modificações ocorridas ao longo dos anos no sistema de produção, como expansão da fronteira agrícola, adoção do sistema de plantio direto, aumento da população de plantas, condições climáticas favoráveis, além de cultivos sucessivos de milho na mesma área, geraram condições ideais para o desenvolvimento de várias doenças foliares.

A Mancha Branca do Milho (MBM), causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001; PACCOLA-MEIRELLES, 2008; BOMFETI et al., 2008) é considerada uma doença endêmica em quase todas as regiões produtoras de milho no Brasil. O início da doença se dá com o surgimento de lesões aquosas, do tipo anasarca, de coloração verde-escuro e que evoluem para lesões necróticas e de coloração palha. São lesões de formato oblongo e irregular, medindo entre 0,3 a 2,0 cm, dependendo do nível de resistência genética do material (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2002).

Nesse sentido, como medidas de controle, são indicados o uso de híbridos resistentes, sendo que, no plantio de cultivares suscetíveis, a utilização de fungicidas tem sido ajustada em produtos pertencentes aos grupos triazóis, estrobilurinas, benzimidazol e oxitetraciclin (PEDRO et al., 2010).

O uso de nanomaterias como agentes antimicrobianos apresenta elevada eficácia biocida. O tamanho inferior a 100nm permite alta relação superfície/volume que admite interações íntimas com as membranas microbianas (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005), sendo que, em cada tamanho, um mesmo material pode apresentar características físicas e químicas completamente diferentes (AKHTAR et al., 2013).

Dessa maneira, a atividade antimicrobiana é determinada por compostos que eliminam as bactérias localmente ou retardam seu crescimento sem prejudicarem o tecido circundante (HAJIPOUR et al., 2012). Uma forma de ajustar as propriedades dos óxidos funcionais é alterar sua estrutura física e eletrônica por meio da dopagem (CALLISTER, 2002). Quando os nanocristais entram em contato com os microrganismos passam a constituir a membrana celular e o interior das células microbianas. Nesse momento, observa-se alterações no sistema respiratório da célula e na permeabilidade, de modo que no interior da célula os nanocristais interagem com os elementos que

constituem o DNA. Por conseguinte há interferência no ciclo celular levando a célula a morte celular programada (SPERLING et al., 2008; ZHANG et al., 2013).

Os nanomateriais têm sido utilizados para várias finalidades, como na indústria alimentícia, no combate de patógenos nos alimentos (SOZER e KOKINI, 2009); contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphillis typhus* e *Staphylococcus aureus* (IRAVANI, 2011).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação bactericida *in vitro* de nanocristais de ZnO dopados com cobre, ferro, manganês, níquel, ouro e prata no controle de *Pantoea ananatis*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC), do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

Para determinação da toxidez dos nanocristais à *Pantoea ananatis*, foram utilizados nanocristais de ZnO dopados com: prata (Ag), níquel (Ni), ferro (Fe), ouro (Au), manganês (Mn) e cobre (Cu) em diferentes concentrações e nanocristais puros (Tabela 1). Os nanocristais foram elaborados no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores, do Instituto de Física da UFU. Cada nanocristal foi preparado a 0,1 g.mL<sup>-1</sup> de solução de NaCl 0,45% e agitadas para homogeneização dos cristais. Posteriormente foram feitas diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>) de cada nanocristal.

**TABELA 1.** Nanocristais em suas respectivas concentrações. Uberlândia - MG, 2017.

Nanocristais Dopados	Concentrações					
ZnO Ag	0,7	1	3	7	9	11
ZnO Au	0,1	0,5	1	5	10	
ZnO Cu	0,1	0,4	1	4	12	
ZnO Fe	0,05	0,5	3	7	11	
ZnO Mn	0,2	0,4	0,8	4	8	12
ZnO Ni	0,7	1	3	11		
Nanocristais Puros	AgO	NiO	Au	FeO	CuO	MnO
ZnO						

ZnOFe: Óxido de Zinco dopado com Ferro; ZnONi: Óxido de Zinco dopado com Níquel; ZnOMn: Óxido de Zinco dopado com Manganês; ZnOCu: Óxido de Zinco dopado com Cobre; ZnOAu: Óxido de Zinco dopado com Ouro; ZnOAg: Óxido de Zinco dopado com Prata; ZnO: Óxido de zinco; FeO: Óxido de Ferro; NiO: Óxido de Níquel; MnO: Óxido de Manganês; CuO: Óxido de Cobre.

O isolado bacteriano UFU A18 de *Pantoea ananatis* pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU foi recuperado e multiplicado em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C. Após 48 horas, o isolado bacteriano foi cultivado em meio de cultura Nutriente Líquido, sob agitação a 150 rpm a 28°C por 24 horas.

A toxidez direta dos nanocristais foi avaliada por meio do halo de inibição do crescimento bacteriano em meio de cultura, em placa de Petri, usando uma camada básica de meio agar-água 2%

e outra camada contendo meio nutriente semi sólido (0,8%) acrescida de 10% da suspensão bacteriana ( $10^9$  UFC mL $^{-1}$ ) (ROMEIRO, 2001). Em seguida, sete discos de papel de filtro esterilizados (6 mm de diâmetro) foram colocados sobre o meio e adicionados 10 µL de solução de cada nanopartícula, nas diferentes diluições. Como controle negativo e positivo foi usada água filtrada e autoclavada e estreptomicina (500 µg.mL $^{-1}$ ), respectivamente. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 28°C por 48 horas. O diâmetro do halo de inibição foi avaliado em centímetros. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (concentração do elemento x 5 diluições), com 3 repetições.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as placas do antibiograma o uso da estreptomicina (1,2 cm) inibiu o crescimento de *Pantoea ananatis*, no entanto, para água (veículo utilizado para aplicação dos nanocristais) não houve formação de halo inibitório.

O nanocristal de ZnO não apresentou efeito bactericida para *Pantoea ananatis* devido à ausência de formação da zona de inibição. Por outro lado, as nanocristais de ZnO dopados com cobre, ferro, manganês, níquel, ouro e prata apresentaram inibição bacteriana com interação significativa entre concentração e diluição dos nanocristais. Em vista disso, os valores dos halos inibitórios para cada amostra foram calculados através da média padrão.

Em relação a dopagem com cobre (Cu), o nanocristal de CuO puro (Figura 1F) foi notavelmente mais tóxico para *P. ananatis* que as concentrações crescentes de Cu (0,1, 0,4, 1,0, 4,0 e 12,0) (Tabela 2). Contudo, a zona de inibição para as amostras diluídas dez vezes ( $10^{-1}$ ), dopadas com concentrações de 0,1, 0,4 e 1,0 de Cu (Figura 1A, B e C) desempenharam melhor efeito inibitório quando comparadas ao controle da nanopartícula de ZnO (Figura 1G). Destacando que a concentração de ZnO 0,4 Cu foi a de melhor desempenho entre as demais, com 0,90 cm e 0,95 cm, para ND e  $10^{-1}$ , respectivamente. Nas diluições cem, mil e dez mil vezes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) não houve formação de halo de inibição em nenhuma das concentrações aplicadas (Figura 1A, B, C, D e E).

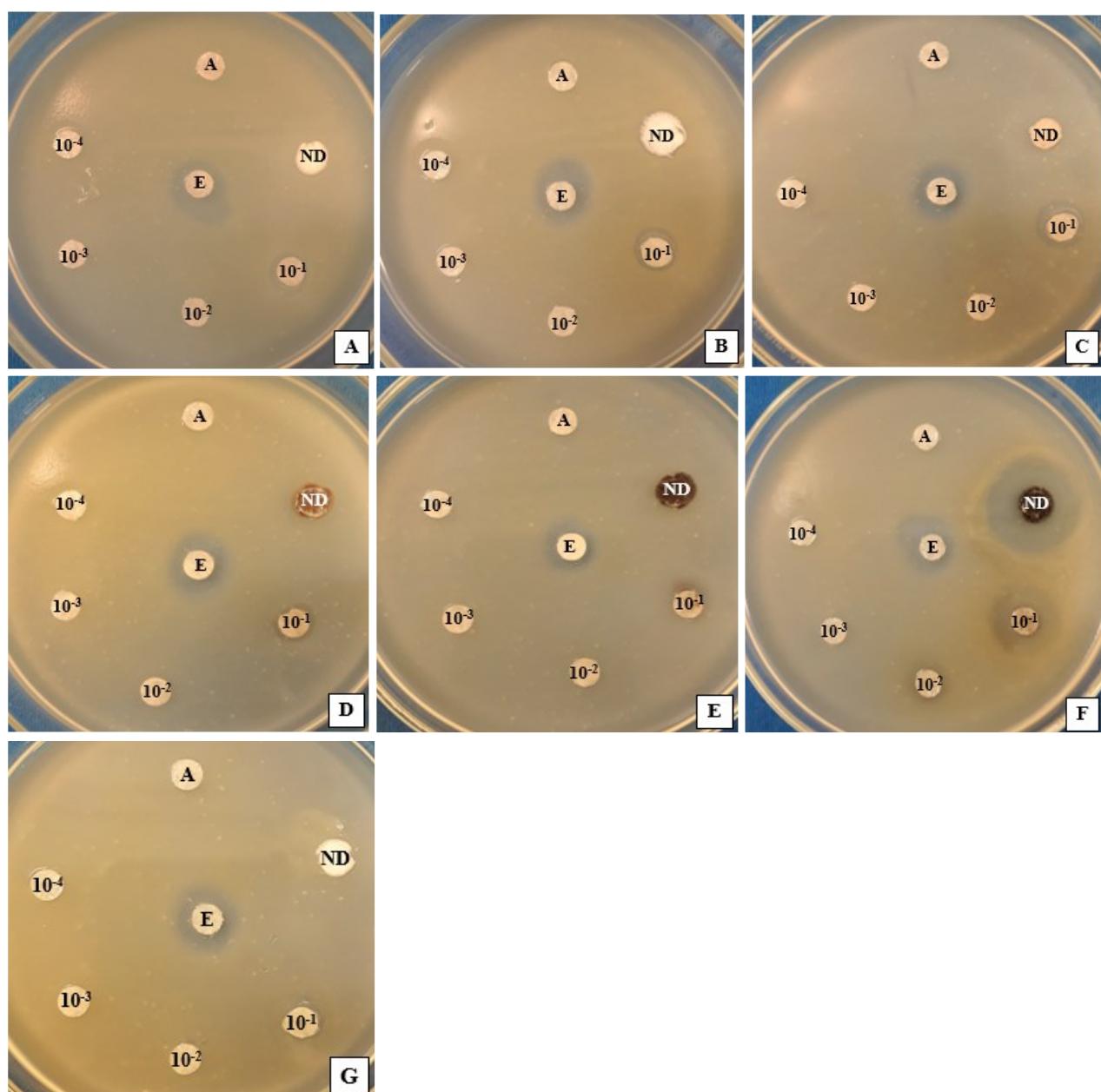
Para os controles, nanocristais de CuO e ZnO (Figura 1 F e G), a partir do teste de Dunnet foi possível observar diferença significativa apenas para nanocristais de CuO. De forma que o nanocristal de CuO inibiu o crescimento bacteriano, com halo de inibição de 1,25 cm, apresentando o melhor desempenho do que ZnO dopado com diferente concentrações de Cu (Tabela 2).

**TABELA 2.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Cu em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

Nanocristais (concentração)	Diluição				
	ND	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ZnO 0,1 Cu	0,00 Bb+	0,90 Aab	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 0,4 Cu	0,90 Aa	0,95 Aa	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 1,0 Cu	0,00 Bb+	0,90 Aab	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 4,0 Cu	0,00 Bb+	0,80 Ab	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 12,0 Cu	0,00 Ab+	0,00 Ac+	0,00 Aa+	0,00 Aa+	0,00 Aa+
CuO	1,25				

ZnO	0,00
CV(%)	20,38

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05. + Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para CuO. \* Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para ZnO.



**FIGURA 1.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de cobre em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.1 Cu, (B) ZnO 0.4 Cu, (C) ZnO 1.0 Cu, (D) ZnO 4.0 Cu, (E) ZnO 12.0 Cu, (F) CuO, (G) ZnO. A= água, E= estreptomicina.

A toxicidade do nanocristal de CuO pode ser explicada devido a maior solubilidade dos íons cobre do que as formas dopadas. Resultados semelhantes foram observados em experimentos *in vitro* para o controle de *Pseudokirchneriella subcapitata* (ARUOJA et al., 2009), alga cloroficea bioindicadora e para *Saccharomyces cerevisiae* (KASEMETS et al., 2009) eucarioto unicelular que pertence ao reino dos fungos verdadeiros.

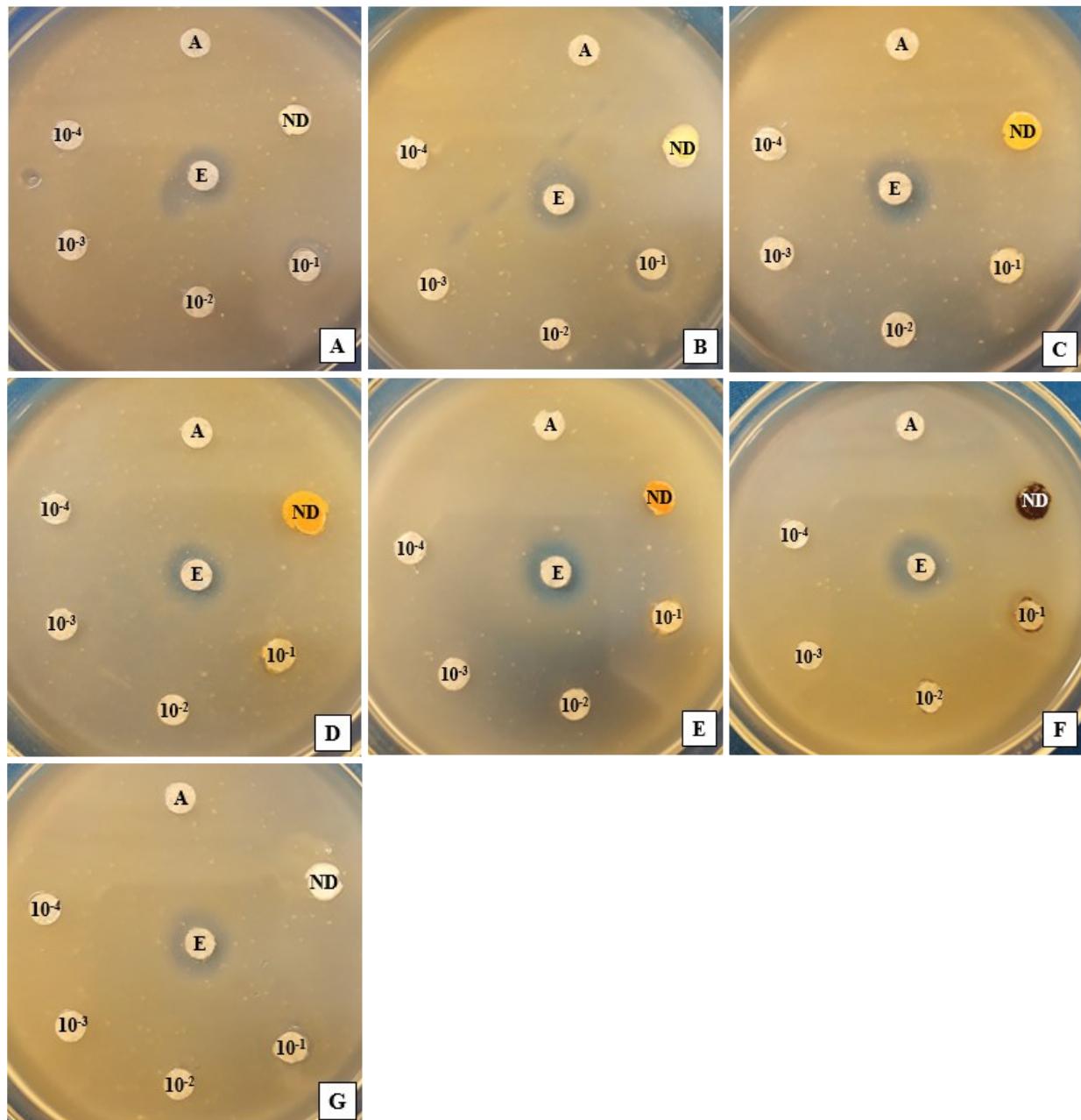
O nanocristal de óxido de ferro (FeO), assim como o óxido de zinco (ZnO), não inibiram o crescimento de *P. ananatis* *in vitro* (Tabela 3). Entre as formas de ZnO dopada, somente a concentração de 0,5 Fe (Figura 2B) apresentou halo de inibição (Tabela 3), tanto na amostra não diluída (ND) (0,85 cm), como na diluída 10 vezes (0,7 cm). Nas diluições cem, mil e dez mil vezes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) não houve formação de halo de inibição em nenhum das concentrações aplicadas (Figura 2A, B, C, D e E).

Em relação aos controles, nos nanocristais de FeO e ZnO (Figura 2 F e G) foi possível observar diferença significativa para o teste de Dunnet, entre as amostras ND e para  $10^{-1}$  para ZnO 0,5 Fe (Tabela 3), confirmando o melhor desempenho do nanocristal de ZnO dopado com 0,5 Fe.

**TABELA 3.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Fe em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

Nanocristais (concentração)	Diluição				
	ND	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ZnO 0,05 Fe	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
ZnO 0,5 Fe	0,85 Aa+*	0,70 Ba+*	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Ca
ZnO 3,0 Fe	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
ZnO 7,0 Fe	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
ZnO 11,0 Fe	0,00 Ab	0,00 Ab	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
FeO	0,00				
ZnO	0,00				
CV (%)	23,70				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05. + Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para FeO. \* Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para ZnO.



**FIGURA 2.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de ferro em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.05 Fe, (B) ZnO 0.5 Fe, (C) ZnO 3.0 Fe, (D) ZnO 7.0 Fe, (E) ZnO 11.0 Fe, (F) FeO, (G) ZnO. A= água, E= estreptomicina.

O efeito tóxico dos nanocristais de Fe e o mecanismo da toxicidade têm sido associados ao recobrimento físico das células bacterianas pelo nanocristal, levando o rompimento da membrana celular e a geração de espécies reativas de oxigênio (TROUILLER et al., 2009; GOMAA et al., 2013; BARNES et al., 2010).

De acordo com Prucek et al. (2011), as propriedades antibacterianas e antifúngicas de nanopartículas de Fe, mesmo em concentrações muito baixas, destroem efetivamente os microrganismos. Além disso, essa nanopartícula também demonstrou efeito citotóxico para *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* var. *niger* (AUFFAN et al., 2008; LEE et al., 2008; DIAO e YAO, 2009; DENG et al., 2014).

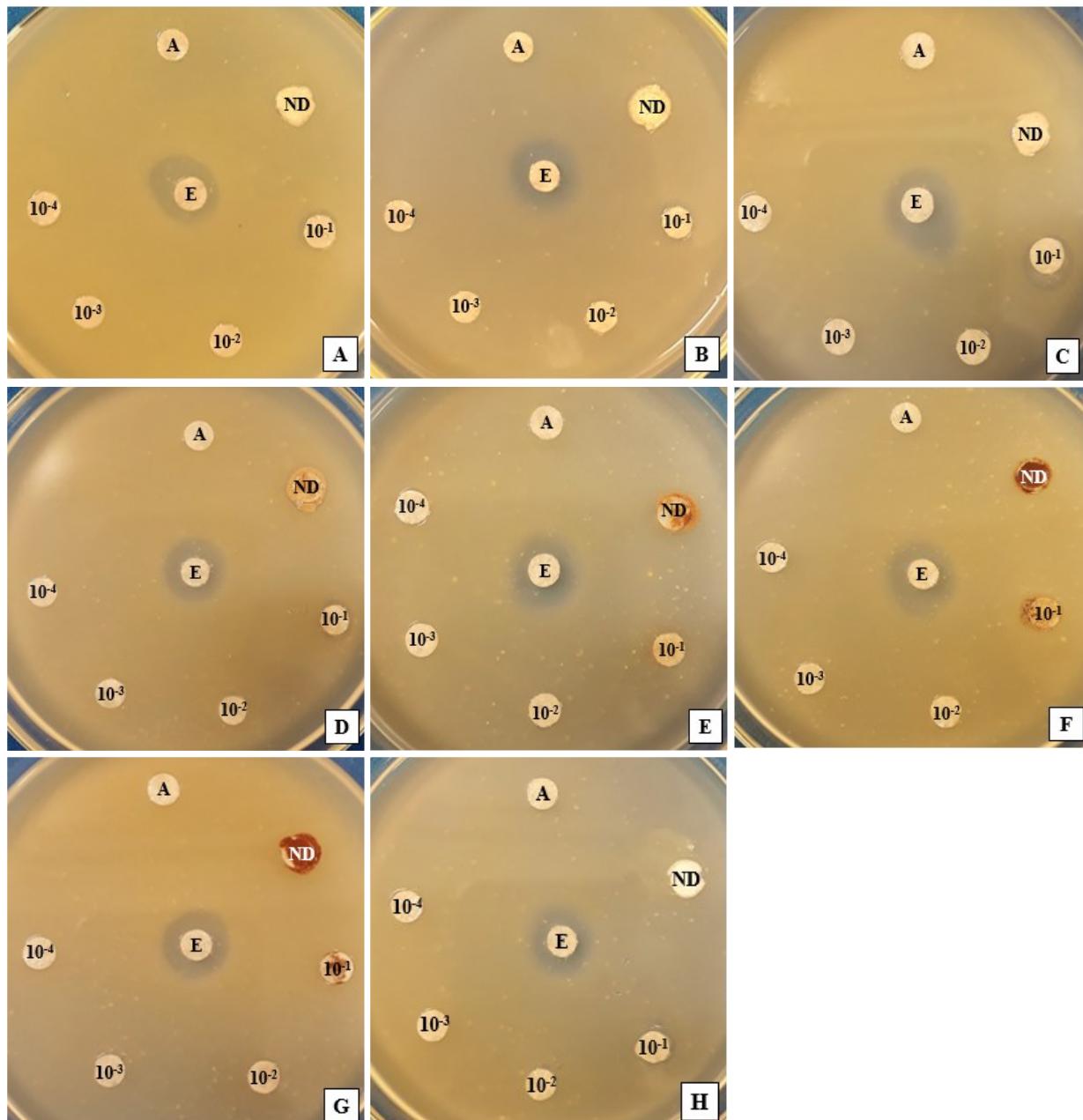
Na Tabela 4 pode-se observar que os nanocristais de ZnO dopados com manganês (Mn) nas concentrações de 0.4, 0.8 e 4.0 apresentaram halo de inibição para *P. ananatis*, tanto nas amostras não diluídas (ND), quanto nas diluídas dez vezes ( $10^{-1}$ ) (Figura 3B, C e D), visto que as concentrações de 0.4 e 0.8 apresentaram os maiores halos de inibição, para ND e  $10^{-1}$ , com 0.90 cm e 0.80 cm, respectivamente. Entretanto, para as diluições cem, mil e dez mil vezes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) não houve formação de halo de inibição em nenhuma das concentrações aplicadas (Figura 3A, B, C, D, E e F).

Em relação aos controles, nos nanocristais de MnO e ZnO (Figura 3G e H), foi possível observar diferença significativa pelo teste de Dunnet, entre as amostras ND nas concentrações 0.4, 0.8 e 4.0 e para  $10^{-1}$  nas concentrações 0.2, 0.4, 0.8 e 4.0 (Tabela 4). Esse resultado, confirma o melhor desempenho na inibição do crescimento bacteriano para as nanopartículas de ZnO dopados com Mn.

**TABELA 4** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Mn em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

Nanocristais (concentração)	Diluição				
	ND	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ZnO 0.2 Mn	0,00 Bc	0,70 Ab+*	0,00 Ba	0,00 Ba	0,00 Ba
ZnO 0.4 Mn	0,90 Aa+*	0,70 Bb+*	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Ca
ZnO 0.8 Mn	0,70 Bb+*	0,80 Aa+*	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Ca
ZnO 4.0 Mn	0,70 Ab+*	0,65 Bc+*	0,00 Ca	0,00 Ca	0,00 Ca
ZnO 8.0 Mn	0,00 Ac	0,00 Ad	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
ZnO 12.0 Mn	0,00 Ac	0,00 Ad	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
MnO	0,00				
ZnO	0,00				
CV (%)	7,77				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05. + Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para MnO. \* Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para ZnO.



**FIGURA 3.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de manganês em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.2 Mn, (B) ZnO 0.4 Mn, (C) ZnO 0.8 Mn, (D) ZnO 4.0 Mn, (E) ZnO 8.0 Mn, (F) ZnO 12.0 Mn (G), MnO, (H) ZnO. A= água, E= estreptomicina.

Apesar de isoladamente os nanocristais de zinco (ZnO) e manganês (MnO) não formarem halo inibitório, a partir da metodologia de impregnação destes íons metálicos, foi possível a preparação de sólidos com propriedades inibitórias ou biocidas. Tal associação, permite a imposição de novas propriedades desejáveis a esses compostos, visto que de acordo com Angioletto (2003), apesar das concentrações empregadas de íons metálicos serem baixas, na ordem de partes por milhão,

ainda são capazes de causar letalidade. Esse efeito pode ser explicado pela ação produzida através da combinação de íons metálicos resultando na desnaturação de células.

De acordo com a Tabela 5, o nanocristal de óxido zinco (ZnO) dopado com níquel (Ni) apresentou atividade antimicrobiana para *P. ananatis* apenas na concentração 0.7 de Ni, com halo de inibição de 0.80 cm, na amostra diluídas dez vezes ( $10^{-1}$ ) (Figura 4A). Para as amostras não diluídas (ND) e nas diluições cem, mil e dez mil vezes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) não houve formação de halo de inibição em nenhum das concentrações aplicadas (Figura 4A, B, C e D).

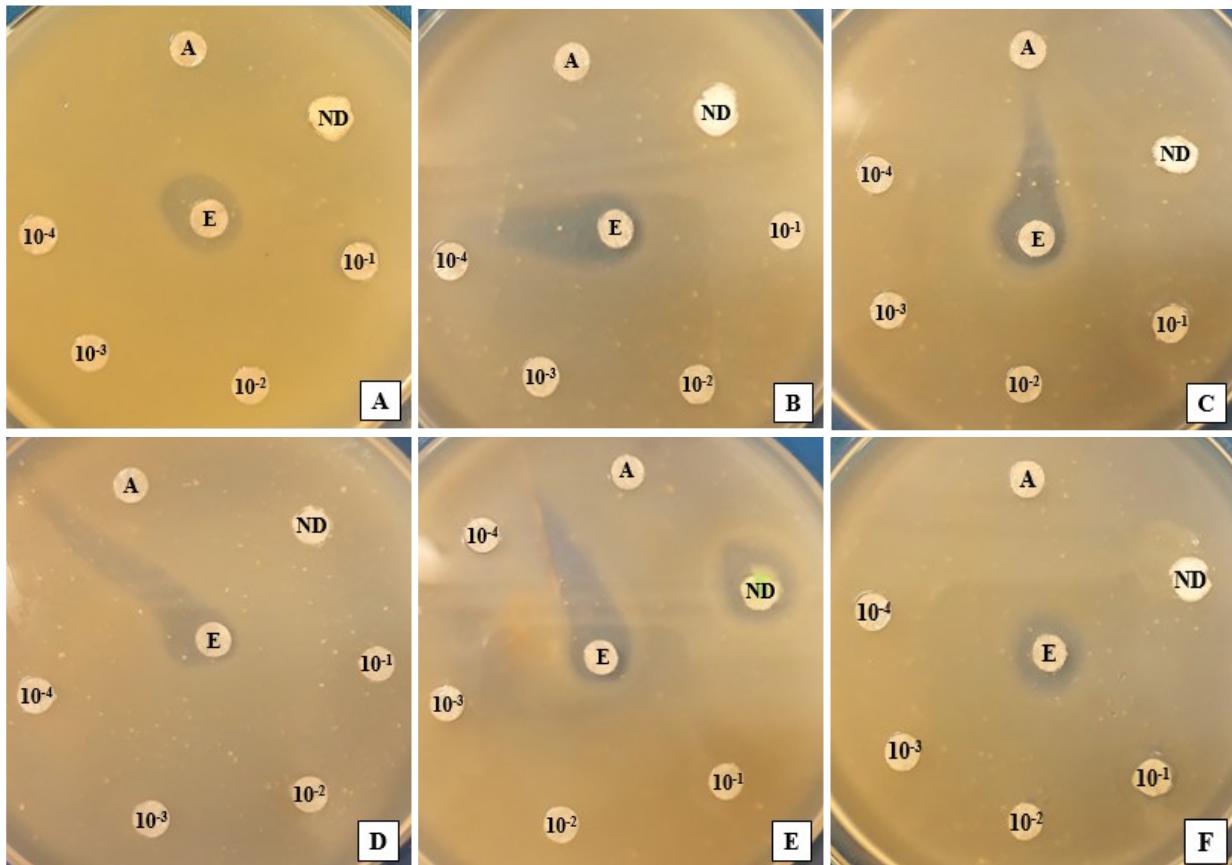
Para os controles, nanocristais de NiO e ZnO (Figura 4 E e F), o nanocristal de NiO apresentou diferença significativa entre as amostras de ZnO dopadas com Ni, com halo inibitório de 1.15 cm, exceto para ZnO 0.7 Ni dez vezes diluída ( $10^{-1}$ ).

Contudo, apesar da amostra de concentração ZnO 0.7 Ni não diluída (ND) e dez vezes diluída ( $10^{-1}$ ) não apresentarem diferença significativa entre o nanocristal NiO para o teste de Dunnett, observa-se que o halo inibitório de NiO foi superior: 1.15 cm.

**TABELA 5.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Ni em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

Nanocristais (concentração)	Diluição				
	ND	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ZnO 0.7 Ni	0,00 Ba+	0,80 Aa	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 1.0 Ni	0,00 Aa+	0,00 Ab+	0,00 Aa+	0,00 Aa+	0,00 Aa+
ZnO 3.0 Ni	0,00 Aa+	0,00 Ab+	0,00 Aa+	0,00 Aa+	0,00 Aa+
ZnO 11.0 Ni	0,00 Aa+	0,00 Ab+	0,00 Aa+	0,00 Aa+	0,00 Aa+
NiO	1,15				
ZnO	0,00				
CV(%)	36,18				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05. + Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para NiO. \* Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para ZnO.



**FIGURA 4.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de níquel em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.7 Ni. (B) ZnO 1.0 Ni. (C) ZnO 3.0 Ni. (D) ZnO 11.0 Ni. (E) NiO. (F) ZnO. A= água, E= estreptomicina.

O níquel (Ni) é um elemento metálico que está naturalmente presente na crosta terrestre. Amplamente utilizado na indústria devido às suas propriedades físicas e químicas (DENKHAUS e SALNIKOW, 2002). Em se tratando de seus efeitos antimicrobianos, Casagrande (2010), ao avaliar o controle de *Streptococcus mutans* *in vitro*, identificou eficiência nos nanocristais de níquel que formaram halo de inibição de 20 mm. Também para o controle de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus aureus* foi possível determinar a toxicidade de NiO (BAEK et al., 2011).

Para os nanocristais de óxido de zinco (ZnO) dopados com ouro (Au) (Tabela 6), observa-se que na concentração de ZnO:1.0 Au da amostra diluída dez vezes ( $10^{-1}$ ) foi descrito o maior halo de inibição (0.80 cm) de *P. ananatis* (Figura 5C), seguida das concentrações ZnO:0.5 Au e ZnO:5.0 Au (0.70 cm) (Figura 5 B e D) nas amostras não diluídas (ND) e  $10^{-1}$ . Já a concentração de ZnO: 0.1 Au (Figura 5A), nas amostras ND) e  $10^{-1}$  foram expressos os menores halos de inibição (0.60 cm).

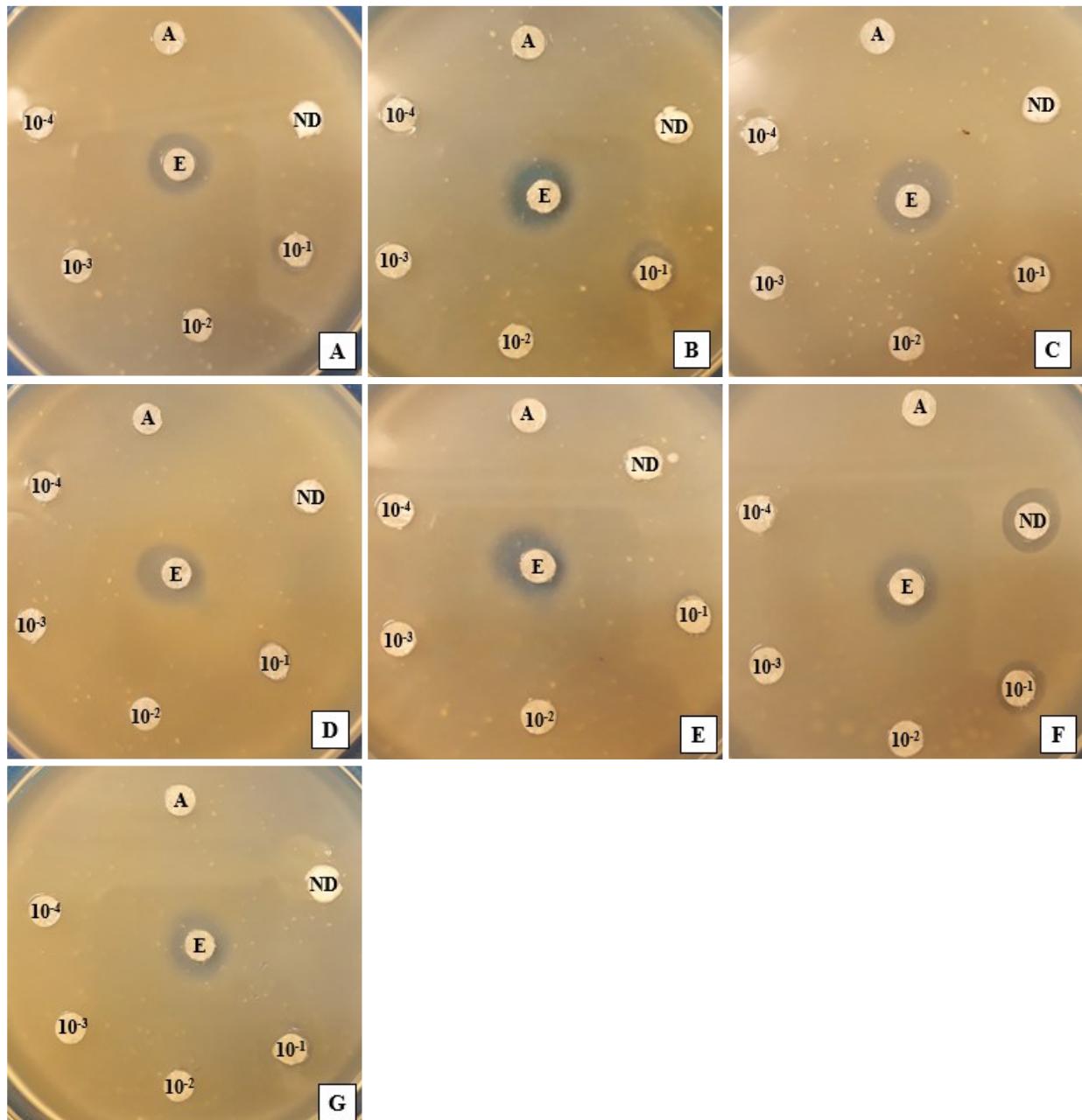
Quanto as diluições cem, mil e dez mil vezes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) não houve formação de halo de inibição em nenhuma das concentrações aplicadas (Figura 5A, B, C, D e E).

Para os controles, Au e ZnO (Figura 5 F e G), apenas o teste de Dunnett para Au foi significativo frente as demais amostras, as quais não apresentaram nenhum halo de inibição. Porém, apesar de exibir halo inibitório de 1,10 cm, não diferiu dos nanocristais de ZnO dopados com Au.

**TABELA 6.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Au em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

Nanocristais (concentração)	Diluição				
	ND	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ZnO 0.1 Au	0,60 Ab	0,60 Ac	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 0.5 Au	0,70 Aa	0,70 Ab	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 1.0 Au	0,70 Ba	0,80 Aa	0,00 Ca+	0,00 Ca+	0,00 Ca+
ZnO 5.0 Au	0,70 Aa	0,70 Ab	0,00 Ba+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 10.0 Au	0,00 Ac+	0,00 Ad+	0,00 Aa+	0,00 Aa+	0,00 Aa+
Au	1,10				
ZnO	0,00				
CV(%)	11.13				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05. + Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para Au. \* Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para ZnO.



**FIGURA 5.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de ouro em diferentes concentrações. (A) ZnO 0.1 Au. (B) ZnO 0.5 Au. (C) ZnO 1.0 Au. (D) ZnO 5.0 Au. (E) ZnO 10.0 Au. (F) Au. (G) ZnO. A= água, E= estreptomicina.

Silva (2017) observou que quanto maior concentração do nanocristal de ouro, maior foi a inibição das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

Em teoria, os nanocristais de ZnO dopados com Au deveriam ter propriedades melhoradas de ligação e penetração na parede celular, fornecendo maior concentração de moléculas fotoativas, já que o mecanismo de toxicidade do ouro envolve a perturbação da conformação proteica da célula

(ALLAKER, 2010). Tal fato pode ser constatado nas nanocristais de ZnO dopadas até a concentração de 5.0 Au, já que para a concentração 10.0 Au a toxicidade do ouro foi perdida.

Acredita-se que a propriedade bactericida dos nanocristais de ouro se dá por causa da alteração estrutural da membrana celular da bactéria, devido a forte ligação com grupos doadores de elétrons das bactérias que é composto de enxofre, oxigênio ou grupos de nitrogênio. Os nanocristais penetram as paredes celulares dos microrganismos inibindo seu crescimento (BALASUBRAMANIAN, 2014).

Para os nanocristais de óxido de zinco (ZnO) dopados com quantidades crescente de prata (Ag), de acordo com a Tabela 6 e Figura 5, pode-se observar que as amostras não diluídas (ND) exibiram amplo espectro de controle da bactéria *P. ananatis*. O maior halo inibitório (1,10 cm) foi alcançado na concentração de ZnO: 11.0 Ag (Figura 6F) para as amostras ND, seguido das concentrações de ZnO: 3.0, 7.0 e 9.0 Ag, com halo de 1,00 cm (Figuras 6 C, D e E).

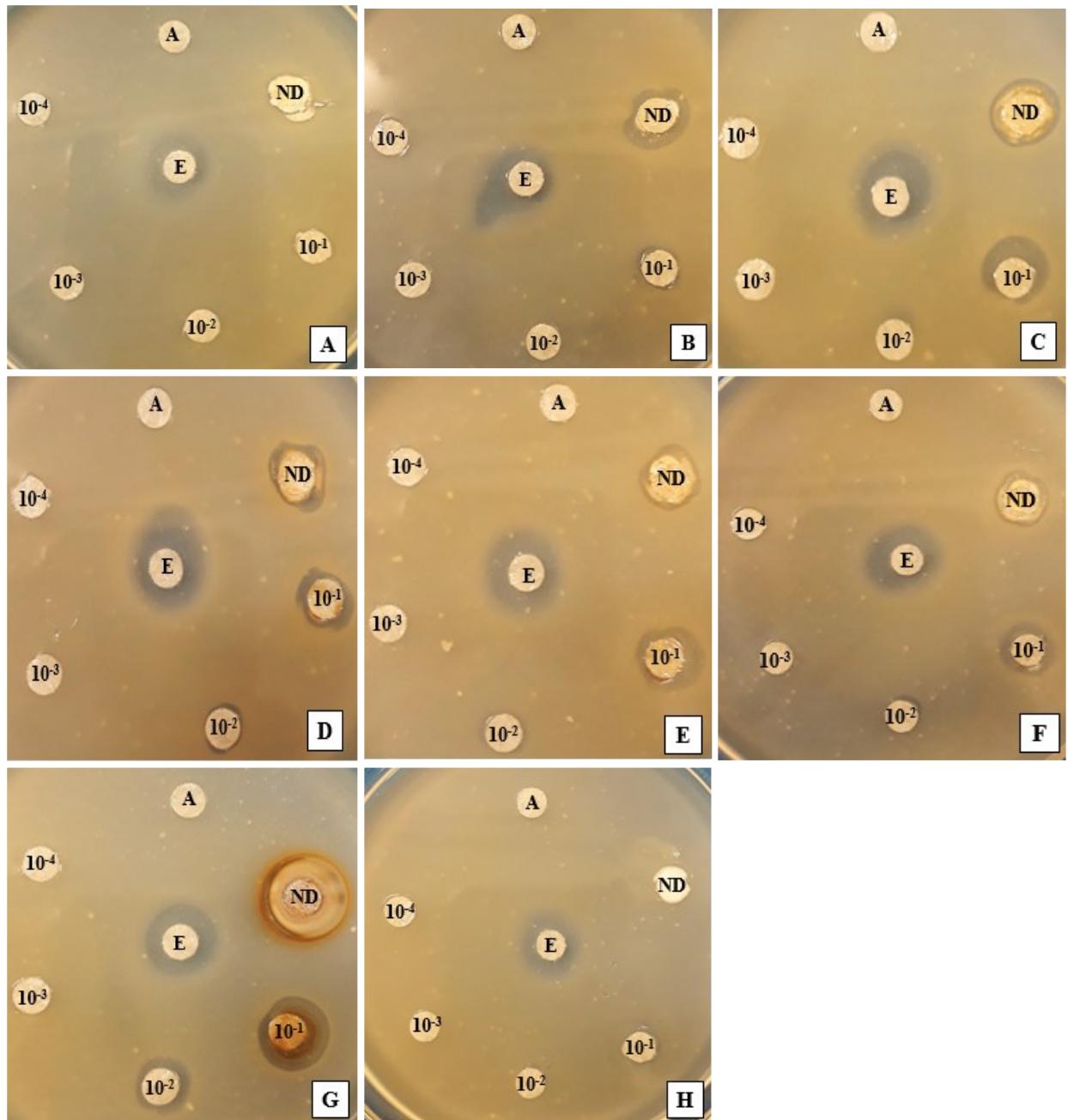
Ao contrário dos demais nanocristais (cobre, ferro, manganês, níquel e ouro) houve formação de halo para ZnO: 9.0 Ag na amostra  $10^{-2}$  com 0,65 cm. Apenas nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  não houve formação de halo de inibição em nenhuma das concentrações aplicadas (Figura 5A, B, C, D e E).

Para os controles com nanocristais de  $\text{Ag}_2\text{O}$  e ZnO (Figura 6 G e H), o teste de Dunnett foi significativo para as duas situações. Em relação a  $\text{Ag}_2\text{O}$ , este diferiu apenas as amostras que não apresentaram nenhum halo de inibição. Porém, apesar de exibir halo inibitório de 0,63 cm não diferiu dos nanocristais de ZnO dopados com Ag. Para ZnO foi detectada diferença significativa entre o controle e a concentração de ZnO: 9.0 Ag na diluição  $10^{-2}$ .

**TABELA 7.** Halo de inibição de crescimento (cm) de *Pantoea ananatis*, por ZnO:Ag em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

Nanocristais (concentração)	Diluição				
	ND	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
ZnO 0,7 Ag	0,80 Ac	0,00 Bc+	0,00 Bb+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 1,0 Ag	0,95 Ab	0,75 Bb	0,00 Cb+	0,00 Ca+	0,00 Ca+
ZnO 3,0 Ag	1,00 Ab	0,95 Aa	0,00 Bb+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 7,0 Ag	1,00 Ab	1,00 Aa	0,00 Bb+	0,00 Ba+	0,00 Ba+
ZnO 9,0 Ag	1,00 Ab	0,95 Aa	0,65 Ba*	0,00 Ca+	0,00 Ca+
ZnO 11,0 Ag	1,10 Aa	1,00 Ba	0,00 Cb+	0,00 Ca+	0,00 Ca+
$\text{Ag}_2\text{O}$	0,63				
ZnO	0,00				
CV(%)	7,59				

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05. + Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para nanocristal de  $\text{Ag}_2\text{O}$ . \* Difere ao nível de 0,05 de significância pelo teste de Dunnett para ZnO.



**FIGURA 6.** Halo de inibição de *Pantoea ananatis* por nanocristais de prata em diferentes concentrações. (A) ZnO 0,7 Ag. (B) ZnO 1,0 Ag. (C) ZnO 3,0 Ag. (D) ZnO 7,0 Ag. (E) ZnO 9,0 Ag. (F) ZnO 11,0 Ag. (G) Ag<sub>2</sub>O, (H) ZnO. A= água, E= estreptomicina.

No combate aos micro-organismos, os nanocristais de prata e ouro estão entre os mais estudados. Esses nanocristais são capazes de agir como bactericida contra mais de 500 micro-organismos patógenos (bactérias, vírus e fungos). É relevante ressaltar que são poucos os relatos sobre desenvolvimento de resistência bacteriana, sendo eficazes tanto em bactérias Gram positivas, quanto

Gram negativas. Outro ponto relevante é a baixa toxicidade para células animais (DASTJERDI; MONTAZER, 2010).

A toxicidade do nanocristal de prata vem sendo mostrada por uma série de estudos *in vitro* contra leveduras, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (MATHIAS et al., 2014; PORTO, 2012). Apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana, para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (XU et al., 2004; GOGOI et al., 2006; ELICHIGUERRA et al., 2002). Investigações quanto ao tamanho, forma, características de superfície e taxa de dissolução, mostraram influência na habilidade dos nanocristais em interagir com sistemas biológicos. Outra vantagem é sua facilidade de obtenção e baixo custo (LOK et al., 2006; ZHANG et al., 2008). Durán et al. (2010) afirmam que existe uma relação entre a estrutura dos nanocristais de prata e sua ação antimicrobiana sobre a bactéria Gram negativa *E. coli*. Assim, quanto maior a concentração deste nanocristal, menor é o crescimento bacteriano.

Os íons de prata liberados das nanocristals durante sua interação com a membrana celular das bactérias podem atuar no fosfato das moléculas do DNA, inativando sua replicação. Outra teoria fundamenta-se na ideia da nanocristal de prata, quando em contato com a membrana celular da bactéria, causar danos estruturais, forçando a dissipação de prótons e, assim, a morte celular (SONDI e SALOPEK - SONDI, 2004; LOK et al., 2006). Uma terceira teoria, seria a reação com proteínas contendo enxofre, induzindo a inibição de funções enzimáticas respiratórias (GUPTA et al., 1998; MATSUMURA et al., 2003).

Estudos na área da nanotecnologia têm ganhado destaque no agronegócio brasileiro, visto que, no Brasil, já existem instituições apoiadas e ligadas à Embrapa que trabalham com a aplicação da nanotecnologia na agricultura, como o Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio e a Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

Entre suas formas de uso temos: controle de doenças e pragas por meio do uso de pesticidas (uso de produtos ligados à superfície de nanocristals ou embebidos dentro de nanocápsulas), diminuição de perdas na pós-colheira (formulação de embalagens comestíveis e biodegradáveis aditivadas com nanocristals que poderão ser pulverizadas sobre frutas e vegetais durante a colheita, para proteção dos alimentos contra pragas e microrganismos) e recuperação de solos degradados e remediação (uso de nanocristals cerâmicas com propriedades catalíticas quando em contato com a água, luz ou calor).

Assim, observa-se que estas tecnologias podem explorar a grande demanda por inovação do agronegócio, já que as possibilidades são inúmeras e as discussões quanto a potencialidades desta nova tecnologia atraem iniciativas empreendedoras para o país.

#### **4. CONCLUSÕES**

A utilização de nanocristais de óxido de zinco (ZnO) não apresentou efeito bactericida para *Pantoea ananatis*.

Nanocristais de ZnO dopados com cobre, ferro, manganês, níquel, ouro e prata inibiram o crescimento de *P. ananatis* *in vitro*.

Nanocristais de óxido de cobre (CuO) e óxido de níquel (NiO) puros apresentaram halo de inibição para *P. ananatis*.

## REFERÊNCIAS

AKHTAR, B.S.; Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS sustainable Chemistry and Engineering**, [S.l.], v.1, p. 591-602, 2013.

ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, Calif., US, v. 89, p. 1175–1186, 2010.

ANGIOLETTI, E. **Desenvolvimento de processo de fabricação de cerâmicas com propriedades antimicrobianas.** 2003, p.107. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

ARUOJA, V.; DUBOURGUIER, H. C.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, NL, v. 407, p. 1461-1468, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>

AUFFAN, M.; ACHOUAK, W.; ROSE, J.; RONCATO, M.-A.; CHANEAC, C.; WAITE, D.T.; MASION, A.; WOICIK, J.C.; WIESNER, M.R.; BOTTERO, J-V. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward Escherichia coli. **Environmental Science & Technology**, Eastons, US, v. 42, p. 6730- 6735, 2008.

BAEK, Y. W.; AN, Y. J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, NL, v. 409, p. 1603-1608, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>

BALASUBRAMANIAN, K. Antibacterial application of polyvinylalcohol-nanogolg composite membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, NL, v. 455, p. 174-178, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.04.050>

BARNES, R.J.; RIBA, O.; GARDNER, M.N.; SINGER, A.C.; JACKMAN, S.A.; THOMPSON, I.P. Inhibition of biological TCE and sulphate reduction in the presence of iron nanoparticles. **Chemosphere**, Oxford, Inglaterra, v. 8, p. 554-562, 2010.

BOMFETI, C. A.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; MASSOLA, J. R. N. S.; MARRIEL, I. E.; MEIRELLES, W. F.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission éléctron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p.1-6, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000100010>

CALLISTER, Jr., **Introdução da Ciência e Engenharia de Materiais**, New York, NY, 2002.

CASAGRANDE, J. J. C. **Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata, cobre, ouro e níquel contra *Streptococcus mutans*.** 2010, p. 26. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Unesc, Criciúma, 2010. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/00004E/00004EFD.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

**COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO** – CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, v. 4 – Safra 2016/17 – Décimo segundo levantamento, Set. 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 22 Nov. 2017.

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. **Colloids and surfaces B, Biointerfaces**, Amsterdam, NL, v. 79, p. 5-18, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.029>

DENG, C.H.; GONG, J.L.; ZENG, G.M.; NIU, C.G.; NIU, Q.Y.; ZHANG, W.; LIU, H.Y. Inactivation performance and Mechanism of Escherichia coli in aqueous system exposed to iron oxide loaded graphene nanocomposites. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, NL, v. 276, p. 66-76, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.011>

DENKHAUS E, SALNIKOW K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, Boca Raton, US, v. 42, p. 35-56, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00214-1)

DIAO, M.; YAO, M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. **Water Research**, New York, US, v. 43, p. 5243-5251, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.051>

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; DE CONTI R, A.O. L.; COSTAB, F. T. M.; BROCCIBI, M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **Journal of Brazilian Chemical Society**, [S.I], v.21, p. 949-959, 2010.

ELICHIGUERRA, J. L.; BURT, J. L.; MORONES, J. R.; CAMACHO-BRAGADO, A.; LARA, H.H.; YACAMAN, M. J. Interation of silver nanoparticles with HIV-I. **Journal nanobiotechnology**, [S.I], v. 29, p. 144-148, 2002.

FERREIRA, D. F. **Estatística multivariada**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. 662 p.

GOGOI, S. K.; GOPINATH, P.; PAUL, A.; RAMESH, A.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY,A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activites of silver nanoparticles. **Langmuir**, Washington, US, v. 22, p. 9322-9328, 2006.

GOMAA, I.O.; KADER, M.H.; SALAH, T. A.; HEIKAL, O. A. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. **Drug Discoveries & Therapeutics**, [S.I.], v. 7, p. 116-123, 2013.

GUPTA, A.; MAYNES.M.; SILVER, S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 64, p. 5042-5045, 1998.

HAJIPOUR, M. J.; FROMM, K. M.; ASHKARRAN, A. A.; ABERASTURI, D. J.; LARRAMENDI, I. R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W. J.; MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 10, p. 499-511, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, Cambridge, Inglaterra, v. 13, p. 2638-2650, 2011.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 60, p. 969-976, 1970.

KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology in Vitro**, Oxford, Inglaterra, v. 23, p. 1116-1122, 2009.

LEE, C.; KIM, J.Y.; LEE, W.I.; NELSON, K.L.; YOON, J.; SEDLAK, D.L. Bactericidal effect of zero-valent iron nano-scale particles on *Escherichia coli*. **Environmental Science & Technology**, Eastond, US, v. 42, p. 4927- 4933, 2008.

LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; TAM, P. K. H.; CHIU, J. F.; CHE, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome research**, Washington, US, v.5, n.4, p.916-924, 2006.

MATHIAS, F. T.; ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M. Avaliação dos efeitos toxicológicos e ambientais de nanopartículas de sais de prata. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, SP, v. 35, p. 187-193, 2014.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 69, p. 4278-4281, 2003.

<https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4278-4281.2003>

MÔRO, G. V.; FRITSCHE NETO, R. **Importância e usos do milho no Brasil**. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (eds). Milho do plantio a colheita. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 09-25.

MORONES, J. R., ELECHIGUERRA, J. L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J. B., RAMIREZ, J. T., YACA- MAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, Inglaterra, v.16, p. 2346–2353, 2005.

PACCOLA-MEIRELLES L. D.; FERREIRA, A. S.; MEIRELLES, W. F.; MARIEL, I. E.; CASELA, C. R. Detections of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brasil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, DE, v. 149, p. 275-279, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00614.x>

PACCOLA-MEIRELLES L. D.; MEIRELLES, W. F.; PARENTONI, S. N.; MARIEL, I. E.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from Phaeosphaeria leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.l.], v. 2, p. 587-590, 2002.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Mancha Branca X *Pantoea ananatis*. In: Congresso nacional de milho e sorgo: Workshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho, 27, 2008, Londrina, **Anais...** Londrina, 2008. CD ROM.

PEDRO, E.S.; GONÇALVES, R.M.; MEIRELLES, W.F.; REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Avaliação de diferentes produtos no controle da mancha branca do milho.** In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Goiânia, 2010.

PORTO, K. B. **Ação antimicrobiana da nanopartícula de prata sobre patógenos.** 2012. 58 f. Monografia (Especialização) - Curso de Odontologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2012.

PRUCEK, R.; TUČEK, J.; KILIANOVÁ, M.; PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; FILIP, J.; KOLAŘ, M.; TOMÁNKOVÁ, K.; ZBOŘIL, R. The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. **Biomaterials**, Surrey, Inglaterra, v. 32, p. 4704-4713, 2011.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

SILVA, I. O. **Nanoestrutura plasmônica de ouro e sua aplicação em nanobiotecnologia têxtil: avaliação antimicrobiana e de citotoxicidade.** 2017. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2017.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bactéria. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, US, v. 275, p. 177-182, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, NL, v.27, p. 82-89, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>

SPERLING, R. A.; GIL, P. R.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society reviews**, London, GB, v. 37, p. 1896-1908, 2008.

TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. **Cancer Research**, Baltimore, US, v. 69, p. 8784-8789, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2496>

XU, X. H.; BROWNLOW, W. J.; KYRIACOU, S. V.; WAN, Q.; VIOLA, J. J. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. **Biochemistry**, Surrey, Inglaterra, v. 42, p. 10300-10313, 2004.

ZHANG, Y.; PENG, H.; HUANG, W. ZHOU, Y.; YAN, D. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, US, v. 325, p. 371-376, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.05.063>

ZHANG, Y.; NAYAK, T. R.; HONG, H.; CAI, W. Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials. **Current molecular medicine**, [S.l.], v. 13, p. 1633-1645, 2013