



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

NAYARA LIMA BAUTE ZANCAN

TERAPIA FOTODINÂMICA E NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE
Xanthomonas campestris pv. *campestris* *IN VITRO* E EM SEMENTES DE CANOLA
NATURALMENTE CONTAMINADAS

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

NAYARA LIMA BAUTE ZANCAN

TERAPIA FOTODINÂMICA E NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE
Xanthomonas campestris pv. *campestris* *IN VITRO* E EM SEMENTES DE CANOLA
NATURALMENTE CONTAMINADAS

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

Orientadora
Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

- Z27t
2018 Zancan, Nayara Lima Baute, 1991
 Terapia fotodinâmica e nanopartículas no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro e em sementes de canola naturalmente contaminadas / Nayara Lima Baute Zancan. - 2018.
 91 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.2018.749>
 Inclui bibliografia.
1. Agronomia - Teses. 2. Canola - Sementes - Teses. 3. Canola - Doenças e pragas - Teses. 4. *Xanthomonas campestris* - Teses. I. Tebaldi, Nilvanira Donizete. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

NAYARA LIMA BAUTE ZANCAN

**TERAPIA FOTODINÂMICA E NANOPARTÍCULAS NO CONTROLE DE
Xanthomonas campestris pv. *campestris* IN VITRO E EM SEMENTES DE CANOLA
NATURALMENTE CONTAMINADAS**

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

APROVADA em 19 de fevereiro de 2018.

Prof.^a Dr.^a Anielle Christine Almeida Silva


UFU

Prof.^a Dr.^a Juliana Araújo Santos Martins

IFTM

Dr.^a Adriana de Andrade Figueiró

UNICAMPO



Prof.^a Dr.^a Nilvanira Donizete Tebaldi
ICIAG-UFU
(Orientadora)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

A Deus.

Aos meus pais Fernando (*in memoriam*) e Valéria.

Ao meu marido Willian

Aos meus irmãos Juliano e Júlia.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

O meu maior agradecimento é a Deus, por ter feito desse objetivo uma realidade e, por ter me dado forças e o suporte necessário para vencer e concluir esta etapa.

Ao meu pai Fernando (*in memoriam*), que de onde estiver está feliz com essa conquista.

À minha mãe Valéria pelas orações, apoio e por acreditar em mais essa fase da minha vida.

Ao meu marido Willian pelo carinho, companheirismo, paciência e incentivo para concretização deste sonho.

Aos meus irmãos Júlia e Juliano pela amizade e apoio.

À minha querida orientadora Nilvanira, que foi peça fundamental: agradeço o acolhimento, os ensinamentos acadêmicos e acima de tudo a amizade.

Minhas amigas e companheiras de Laboratório Lara e Morgana, que me acompanharam e ajudaram dia a dia, com muita alegria.

Aos técnicos de Laboratório Roberto, Júlia e Adílio por auxiliar e permitir o uso de equipamentos.

Ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), localizado no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

À Professora Flávia, por colaborar com a doação de sementes de canola.

À Professora Denise, pela ajuda nessa jornada da Pós-Graduação.

À Professora Anielle, por conceder o material necessário para realização de parte deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa durante esse período.

Ao ICIAG e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia.

Meu muito obrigada a todos que, de alguma forma, estiveram envolvidos na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------|
| RESUMO GERAL | i |
| GENERAL ABSTRACT | ii |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Cultura da canola | 3 |
| 2.2 Podridão negra | 5 |
| 2.3 Tratamento de sementes | 6 |
| 2.4 Terapia fotodinâmica | 8 |
| 2.5 Nanopartículas | 10 |
| REFERÊNCIAS | 13 |
| CAPÍTULO 1: Terapia fotodinâmica no controle de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris in vitro</i> e no tratamento de sementes de canola naturalmente contaminadas | 22 |
| RESUMO | 22 |
| ABSTRACT | 23 |
| 1 INTRODUÇÃO | 24 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 2.1 Preparo da suspensão bacteriana | 26 |
| 2.2 Terapia fotodinâmica no controle de <i>Xcc in vitro</i> | 26 |
| 2.3 Terapia fotodinâmica no tratamento de sementes de canola | 27 |
| 2.3.1 Detecção de <i>Xcc</i> em sementes de canola | 27 |
| 2.3.2 Teste de sanidade de sementes de canola | 27 |
| 2.3.3 Teste padrão de germinação de canola | 28 |
| 2.3.4 Índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas | 28 |
| 2.4 Análise estatística | 29 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 3.1 Terapia fotodinâmica no controle de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris in vitro</i> | 30 |
| 3.2 Terapia fotodinâmica no tratamento de sementes de canola | 33 |
| 3.2.1 Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> e sanidade de sementes de canola | 33 |
| 3.2.2 Germinação, Índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas de sementes de canola | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 4 CONCLUSÕES | 42 |
| REFERÊNCIAS | 43 |
| CAPÍTULO 2: Nanopartículas no controle de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> in vitro e no tratamento de sementes de canola naturalmente contaminadas | 47 |
| RESUMO | 47 |
| ABSTRACT | 48 |
| 1 INTRODUÇÃO | 49 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 51 |
| 2.1 Toxidez de nanocristais à <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 51 |
| 2.2 Tratamento de sementes de canola com o nanocristal ZnO:11Ag | 52 |
| 2.2.1 Detecção de <i>Xcc</i> em sementes de canola | 53 |
| 2.2.2 Teste padrão de germinação das sementes de canola | 53 |
| 2.2.3 Índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas | 54 |
| 2.3.4 Teste de sanidade de sementes de canola | 54 |
| 2.3 Análise estatística | 54 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 3.1 Toxidez de nanocristais à <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> | 56 |
| 3.1.1 Nanocristais de prata (Ag) | 56 |
| 3.1.2 Nanocristais de manganês (Mn) | 58 |
| 3.1.3 Nanocristais de ouro (Au) | 60 |
| 3.1.4 Nanocristais de cobre (Cu) | 62 |
| 3.1.5 Nanocristais de níquel (Ni) | 64 |
| 3.1.6 Nanocristais de ferro (Fe) | 66 |
| 3.2 Uso de nanocristais no tratamento de sementes de canola | 68 |
| 3.2.1 Detecção de <i>Xcc</i> e sanidade de sementes de canola | 69 |
| 3.2.2 Germinação de sementes e índice de velocidade de emergência de plântulas de canola | 71 |
| 4 CONCLUSÕES | 75 |
| REFERÊNCIAS | 76 |

RESUMO GERAL

ZANCAN, N. L. B. **Terapia fotodinâmica e nanopartículas no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro e em sementes de canola naturalmente contaminadas.** 2018. 91f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

A tropicalização da canola (*Brassica napus*) e sua recente introdução no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba evidenciam a importância de que as sementes a serem utilizadas estejam livres de patógenos. A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), agente causal da podridão negra das brássicas, é disseminada principalmente pelas sementes. Dessa forma, métodos alternativos de controle da bactéria nas sementes devem ser avaliados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia dos métodos terapia fotodinâmica e o uso de nanopartículas no controle de *X. campestris* pv. *campestris* in vitro e no tratamento de sementes de canola. Na terapia fotodinâmica foram utilizados os corantes fotossensíveis Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a combinação de ambos, em diferentes concentrações in vitro e no tratamento de sementes. Diferentes nanopartículas, em diferentes concentrações foram avaliadas no controle de Xcc in vitro e no tratamento de sementes. Nas sementes tratadas foram avaliadas a porcentagem de germinação, a emergência, o índice de velocidade de emergência, o teste de sanidade e a detecção da bactéria nas sementes. Os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a associação deles nas concentrações 100, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, quando submetidos à irradiação, foram eficazes no controle de Xcc in vitro. Os nanocristais de ZnO dopados com Ag, Au, Cu, Fe, Mn e Ni inibiram o crescimento bacteriano in vitro em diferentes concentrações, no entanto, o nanocristal de ZnO:11Ag apresentou o maior halo de inibição. Não foi possível estimar a eficiência dos corantes e das nanopartículas no controle da bactéria nas sementes, devido à baixa taxa de infecção das mesmas. Ensaios deverão ser conduzidos para avaliar diferentes concentrações dos corantes e das nanopartículas, no controle da bactéria em sementes, visto que estes apresentaram toxicidade às sementes de canola.

Palavras-chave: Azul de Metileno, Azul de Toluidina, *Brassica napus*, tratamento de sementes, nanopartículas.

GENERAL ABSTRACT

ZANCAN, N.L.B. **Photodynamic therapy and use of nanoparticles in the control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro and in naturally contaminated canola seeds**. 2018. 91f. Dissertation (Master Degree in Agronomy/Plant Pathology) – Federal University of Uberlandia, Uberlândia.

Canola (*Brassica napus*) has been introduced in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba in the recent years, but to keeping it up growing the seeds used must be free of pathogens. One of the most important bacterium disseminated through the canola seeds is *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) causal agent of black rot in brassicas. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficacy of photodynamic therapy methods and the use of nanoparticles for the control of *X. campestris* pv. *campestris* in vitro and in the canola seed treatment. In the experiment of photodynamic therapy were used the photosensitive dyes, Methylene Blue, Toluidine Blue and the combination of both in different concentrations in vitro and in the seed treatment. In the second experiment were used different nanoparticles and its concentrations to the control of Xcc in vitro and in the seed treatment. Germination percentage, emergence rate, emergence speed index, sanity test and detection of the bacterium in the seeds were evaluated. Methylene Blue, Toluidine Blue and their association at concentrations 100, 50 and 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectively, under irradiation were effective to the Xcc control in vitro. The nanocrystals from ZnO doped with Ag, Au, Cu, Fe, Mn and Ni inhibited the bacterial growth in vitro using different concentrations, however, the nanocrystal ZnO:11Ag showed the larger bacterial inhibition halo. Therefore, it was not possible to estimate the effectiveness of the dyes and nanoparticles in the control of the bacteria in the seeds due to the low infection rate. Thus, new assays should be conducted to evaluate the concentration of dyes and nanoparticles in the control of the bacteria in seeds mainly because it presented toxicity to the canola seeds.

Keywords: Methylene blue, Toluidine blue, *Brassica napus*, seed treatment, nanoparticles.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A canola é uma cultura que foi selecionada por melhoristas canadenses a partir da planta colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) e apresenta como uma boa opção para os sistemas de cultivo no Brasil (BAIER; ROMAN, 1992). A cultura foi recentemente introduzida no Triângulo Mineiro e Alta Paranaíba.

Sabe-se que a cultura da canola se destaca como a terceira oleaginosa mais cultivada no mundo (TOMM, 2015). No Brasil, na safra do ano de 2017 a área plantada foi de aproximadamente 48 mil hectares, alcançando uma produtividade média de 1281 kg ha⁻¹, em torno de 16% a menos em relação à safra passada. Os Estados do Rio Grande do Sul e Paraná são os principais produtores e também os responsáveis por essa produção (CONAB, 2017). O cultivo de grãos da canola tem grande importância para a extração de óleo comestível e produção de biodiesel. Além disso, é possível também a extração de farelo para produção de ração animal, por ser um suplemento proteico de ótima qualidade (TOMM, 2007).

Diante da importância dessa cultura, a podridão negra causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc) é uma das doenças que mais pode prejudicar as brássicas, ocasionando perdas de produtividade e de qualidade dos produtos (VILLETH et al., 2009). A bactéria é disseminada pelas sementes, podendo ser introduzida em novas áreas de cultivo. Ademais, o controle químico não é eficiente para o controle de fitobactérias (ROMEIRO, 2005).

Assim, há a necessidade de estudos e formas alternativas para o controle de Xcc nas sementes, que não afetem a qualidade fisiológica das mesmas e erradiquem o patógeno, como o uso da terapia fotodinâmica e de nanopartículas. Essas alternativas são importantes, uma vez que o uso excessivo ou indevido dos agrotóxicos pode gerar problemas ambientais e a saúde humana (FURLANETO, 2011).

A terapia fotodinâmica consiste na inativação dos micro-organismos, no caso da bactéria *Xanthomonas* spp., pela utilização de corantes fotossensíveis, que aderidos à superfície das sementes, e posteriormente expostas à radiação infravermelha, ocasionam a inativação de compostos da membrana da bactéria importantes à sobrevivência desse patógeno, levando à morte do mesmo (FERREIRA, 2012). Para maximizar a terapia fotodinâmica, espera-se que um fotossensibilizador apresente eficiência fotoquímica, seja biologicamente estável, provoque toxicidade mínima aos tecidos no escuro, seja de fácil eliminação e administração e tenha ação localizada (ZHU; FINLAY, 2008).

Nesse sentido, a nanotecnologia é a habilidade de manipular átomos e moléculas individualmente para produzir materiais em escala manométrica, visando aplicações em diversas áreas de interesse (MILLER, 2005) e a possibilidade de uso no tratamento de sementes no controle de fitopatógenos. O desenvolvimento de nanopartículas é de grande interesse, uma vez que a depender do tamanho, composição e fase apresentam propriedades físicas e químicas diferentes (NOGUERIA, 2013).

O tamanho manométrico das nanopartículas permite a sua entrada pela membrana da bactéria e, a depender do tipo de composição, pode gerar espécies reativas de oxigênio, levando à morte da bactéria (SAWAI; YOSHIKAWA, 2004). Dessa forma, a nanotecnologia tornou-se uma nova estratégia no manejo de doenças, que segundo Furlaneto (2011), compreende uma inovação na área tecnológica da agricultura.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso da terapia fotodinâmica e de nanopartículas no controle de *Xcc in vitro* e no tratamento de sementes de canola no controle da bactéria. Os objetivos específicos foram avaliar o uso de corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a combinação deles, irradiados ou não, no controle de *Xcc in vitro*; o uso dos mesmos corantes, irradiados ou não, no tratamento de sementes de canola para o controle de *Xcc*; o uso de nanocristais de diferentes composições no controle de *Xcc in vitro* e o uso do nanocristal ZnO: 11Ag no tratamento de sementes de canola, no controle de *Xcc*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da Canola

A canola é uma oleaginosa que faz parte da família Brassicaceae, gênero *Brassica* (DIAS, 1992). O termo "canola" significa "azeite canadense de baixo teor ácido" ("Canadian Oil, Low Acid") (THOMAS, 2003). Recentemente, a cultura vem se expandindo para o centro-oeste brasileiro. Essa cultura apresenta-se como uma excelente alternativa para a rotação de cultura, podendo utilizar-se da mesma estrutura e equipamentos disponíveis nas propriedades, tornando assim uma opção economicamente rentável ao produtor (TOMM et al., 2009).

A cultura destaca-se como a terceira oleaginosa mais cultivada no mundo (TOMM, 2015). Na União Europeia encontram-se os maiores produtores e consumidores mundiais de canola e a China é considerada o segundo maior país produtor e consumidor da cultura (USDA, 2016).

O cultivo de canola se enquadra nos sistemas de produção de grãos, sendo uma excelente opção de cultivo, por colaborar na diminuição de problemas fitossanitários de leguminosas, como a soja e o feijão, e das gramíneas, como o milho e trigo. Assim, a utilização da canola pode auxiliar na estabilidade e a qualidade da produção de grãos (TOMM, 2007)

No Brasil, na safra de 2017 a área plantada foi de aproximadamente 48 mil hectares, alcançando uma produtividade média de 1281 kg ha⁻¹, em torno de 16% a menos em relação à safra passada. Os estados do Rio Grande do Sul e Paraná são os principais produtores e os responsáveis por essa produção (CONAB, 2017).

A produção de grãos da canola tem grande importância para a extração de óleo comestível e produção de biodiesel. Além disso, por ser um suplemento proteico de ótima qualidade, é utilizada como farelo para a produção de ração animal (TOMM, 2007). Os grãos de canola produzidos no Brasil possuem cerca de 7 a 24% de proteína e, em média, 38% de óleo. O termo genérico internacional canola não é uma marca registrada industrial, sua descrição oficial é um óleo com menos de 2% de ácido erúico e menos de 30 µmol de glucosinolatos por grama de matéria seca da semente (TOMM, 2007).

O óleo bruto gerado pela canola ou pela extração com solventes, possui cerca de 95 a 98% de triglicerídeos. Não é desejada a eliminação total do ácido erúico no óleo.

obtido, pois este em pequenas quantidades pode ser benéfico. O ácido erúico tem a capacidade de inibir a ação da lipoxigenase, que oxida os ácidos graxos insaturados, evitando a rancidez das sementes oleaginosas (GRIMALDI, 1994). Diante disso, o uso de óleo de canola vem sendo indicado por especialistas da área da saúde para pessoas interessadas em dietas saudáveis.

A planta de canola é semelhante a colza quanto ao ciclo vegetativo, arquitetura, às condições climáticas e de solo exigidas, no entanto, apresentam diferença quando a qualidade do óleo extraído das sementes. Nas sementes de colza é encontrada uma quantidade significativa de glucosinolatos e de ácido erúico, que em altas concentrações podem ser tóxicos aos seres humanos (AMAR et al., 2008).

A temperatura ideal para o desenvolvimento do ciclo da canola é de 20°C, com temperaturas do ar oscilando entre 12 e 30°C. O crescimento das plantas não ocorre em temperaturas abaixo de 5°C. No entanto, temperaturas a partir de 27 °C podem ocasionar problemas, como o aborto de flores. Por isso, a canola é beneficiada por temperaturas do ar mais baixas, entre a emergência ao florescimento, sendo o melhor intervalo para desenvolvimento entre 13 a 22 °C (MORRISON et al., 1989; NANDA et al., 1995). Tanto altas temperaturas, quanto baixas podem afetar o desenvolvimento da planta, uma vez que a canola é uma cultura com origem em clima temperado.

A canola é capaz de se adaptar a diversos tipos de solo, entretanto desenvolve-se melhor em solos de textura média. O pH do solo deve estar entre 5,5 a 6,0 para que permita a melhor disponibilidade dos nutrientes que são essenciais para o desenvolvimento da cultura (TOMM, 2007).

Segundo Thomas (2003), um bom potencial produtivo é atingido mesmo com baixas quantidades de água, sendo suficientes 350 mm de água. No entanto, na época de floração, a cultura é mais exigente em água, o déficit hídrico pode prejudicar a cultura no enchimento de grãos e no teor de óleo. Por outro lado, o excesso de água no solo pode prejudicar a cultura, tanto na absorção de nutrientes, quanto no sistema radicular.

No Brasil, a canola é cultivada sob o sistema de plantio direto, uma vez que este oferece vantagens econômicas e ambientais, tais como a redução no trânsito de máquinas na lavoura, maior conservação do solo, economia na demanda por fertilizantes, melhoria nas características do solo, redução de ocorrência de plantas daninhas, doenças e pragas na lavoura (TOMM et al., 2009).

Além disso, o manejo de doenças é imprescindível. Dessa forma, doenças como, canela preta (*Leptosphaeria maculans*), podridão negra, entre outras devem ser evitadas através do uso de sementes livres dos patógenos ou genótipos resistentes.

2.2 Podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

A podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc), foi descrita pela primeira vez por Garman em 1890 (ALVAREZ, 2000). A partir de então, esta doença vem sendo relatada em todas as regiões do mundo onde há o plantio de brássicas (ALVAREZ; CHO, 1978; SCHAAD; THAVEECHAI, 1983; MASSOMO et al., 2003; MIRIK et al., 2008; JENSEN et al., 2010; POPOVIĆ et al., 2013) e tem causado perdas de produtividade e de qualidade dos produtos (VILLETH et al., 2009).

A podridão negra se desenvolve em climas quentes e úmidos, no entanto esta doença pode ser mais problemática nas regiões tropicais, subtropicais e continentais úmidas. Em climas frios a doença também se instala nas plantas, mas dificilmente evolui a ponto de destruir toda a planta (WILLIAMS, 2007). Temperaturas entre 28 e 30 °C são ideais para o desenvolvimento da doença. A bactéria penetra no hospedeiro por aberturas naturais, como hidatódios e estômatos, e também por ferimentos dos tecidos. Assim, a presença de água de irrigação, chuva ou condensação é imprescindível para favorecer a penetração (SIQUEIRA et al., 1985).

A bactéria Xcc é gram-negativa, aeróbia obrigatória se movimenta através de um único flagelo polar. Produz colônias amarelas brilhantes, mucoide, em meio de cultura YDC, cresce a 35 °C, hidrolisa amido e esculina, produz ácido a partir de arabinose e alcaliniza leite de litmus (SCHAAD et al., 2001; ROMEIRO, 2005; KADO, 2010; LUGO et al., 2013; VAUTERIN et al., 1995). A cor amarela da colônia, típica do gênero *Xanthomonas*, se explica pela presença do pigmento denominado xanthomonadina (STARR; STEPHENS, 1964; HE et al., 2011), que a protege do estresse fotooxidativo, possuindo um importante papel na aptidão ecológica da bactéria (POPLAWSKY et al., 2000; VICENTE; HOLUB, 2013).

Os sintomas da doença podem ser observados em qualquer estágio fenológico da planta infectada, como lesões amareladas em forma de “V” invertido, a partir do bordo das folhas, devido a penetração pelos hidatódios. Inicialmente é notada uma mancha clorótica, que evolui convertendo-se a uma lesão necrótica com bordos amarelados,

diante disso as folhas podem começar a cair prematuramente (ASSIS et al., 1999; VICENTE; HOLUB, 2013). Além disso, pode ser notado o escurecimento das nervuras, decorrente da colonização do sistema vascular (WILLIAMS, 2007). No entanto, segundo Schaad (1982), os sintomas da podridão negra podem ser mascarados, como, por exemplo, pela ocorrência de míldio, dificultando o diagnóstico de podridão negra.

A sobrevivência e disseminação de Xcc se dá principalmente por sementes (TEBALDI et al., 2007), seja internamente ou na superfície, porém também pode-se encontrar a bactéria em solos, restos de culturas doentes (SCHAAD; WHITE, 1974; SCHULTZ; GABRIELSON, 1986), plantas daninhas (SCHAAD; DIANESE, 1981; KUAN et al., 1986) e/ou plantas remanescentes no campo (MARINGONI, 2005) e pode sobreviver na superfície da planta de forma epifítica (TIMMER et al., 1987; DANE; SHAW, 1996; ARIAS et al., 2000). A dispersão da bactéria pode ocorrer a curtas e longas distâncias. A curta distância ocorre mediante respingos de água da chuva e irrigação, aerossóis, insetos e máquinas contaminadas; a longa distância se dá por sementes ou mudas infectadas (ALVAREZ, 2000; KOCKS et al., 1999; GRIESBACH et al., 2003; MARINGONI, 2005; VAN DER WOLF; VAN DER ZOUWEN, 2010; KRAUTHAUSEN et al., 2011).

Mesmo que a taxa de infecção em sementes seja baixa, as sementes infectadas são importantes fontes de inóculo para ocorrência de epidemias (ROBERTS et al., 1999; KRAUTHAUSEN et al., 2011). Dessa maneira, a presença de apenas três sementes infectadas por Xcc em um lote de 10.000 sementes é o bastante para ocorrência de epidemias no campo (LEE et al., 2009). Xcc, além de infectar e infestar as sementes, podem ficar assintomáticas, dificultando assim sua diagnose visual (GITAITIS; WALCOTT, 2007).

Por meio de práticas de manejo, como a rotação de culturas, a retirada de restos culturais de espécies de brássicas, a eliminação de plantas daninhas, o tratamento de sementes e o uso de cultivares resistentes, é possível realizar o controle da podridão negra (GRIESBACH et al., 2003; VICENTE e HOLUB, 2013). Por isso, o uso de sementes livres do patógeno é uma das práticas mais relevantes e indispensáveis para o manejo da doença (MASSOMO et al., 2004; WILLIAMS, 1980; MARINGONI, 2005).

2.3 Tratamento de sementes

A semente é o veículo que leva ao agricultor todo o potencial genético de uma cultivar com características superiores (PESKE; BARROS, 2003). Nesse sentido, o tratamento de sementes é uma medida indispensável para atingir o maior potencial da cultura.

O tratamento de sementes consiste no controle de patógenos, erradicando aqueles associados às sementes, tanto os localizados internamente, quanto externamente. Tais tratamentos atuam protegendo as sementes e plântulas de patógenos do solo, impedindo a transmissão dos micro-organismos da semente para a plântula; conferindo certa proteção nos estágios iniciais de seu desenvolvimento; diminuindo a fonte de inóculo, impedindo assim, o surgimento de epidemias no campo e reduzindo os custos com defensivos da parte aérea das plantas (DHINGRA et al., 1980).

A eficácia do tratamento de sementes buscando o controle de doenças, depende do tipo de patógeno e em qual parte da semente ele está alocado, além do vigor da semente, da disponibilidade de produtos e dos processos adequados para o tratamento (MENTEN; MORAES, 2010).

Segundo Machado (2010), a parcela de contribuição da semente pode chegar a 20% em um sistema de produção de acordo com sua qualidade, mantidas favoráveis as demais condições para tal cultivo. O tratamento de sementes constitui-se como uma medida de controle de baixo custo, variando de 0,5 a 1,0% do custo de produção das culturas (MENTEN; MORAES, 2010).

Espécies de *Xanthomonas* tem como a principal forma de contaminação da planta, o uso de sementes infectadas pela bactéria. Mesmo níveis baixos de contaminação da semente, pelo patógeno, podem causar graves epidemias e perdas consideráveis no campo (CARMO et al., 2004).

A termoterapia é o principal método físico utilizado no controle do patógeno, seja através do calor ou pela imersão das sementes em água aquecida, seja pelo uso de ar quente e de correntes de vapor. A temperatura na termoterapia deve ser bem controlada, pois as sementes, assim como os patógenos, podem ser sensíveis ao calor (CARMO et al., 2004; GRONDEAU; SAMSON, 1994). Dessa forma, a eficiência da termoterapia depende da sensibilidade da semente a temperaturas elevadas.

O uso do tratamento químico de sementes, visando o controle de bactérias fitopatogênicas, é realizado, na maioria dos casos, utilizando substâncias desinfetantes, como ácidos em baixas concentrações e bactericidas. Contudo, esses compostos podem influenciar negativamente na germinação e no vigor das sementes (FERREIRA, 2012).

O tratamento de sementes com ácido clorídrico demonstrou-se eficiente no controle da bactéria *Xanthomonas* spp., no entanto indicou prejuízo quanto a qualidade das sementes (MARINGONI; KUROSZAWA, 1994; CARMO et al., 2004).

Portanto, formas alternativas no controle de fitobactérias em sementes capazes de erradicar os patógenos, não afetando a qualidade fisiológica das mesmas, devem ser avaliadas. Diante disso, neste trabalho investigou-se duas tecnologias no tratamento de sementes de canola.

2.4 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste na inativação dos micro-organismos, no caso da bactéria *Xanthomonas* spp. por meio da utilização de corantes fotossensíveis, que aderidos à superfície das sementes, e posteriormente expostas à radiação infravermelha, ocasionam a inativação de compostos da membrana bacteriana, importantes à sobrevivência do patógeno, levando à morte do indivíduo ou da população (FERREIRA, 2012). Na terapia fotodinâmica, a interação entre o agente fotossensibilizador e a fonte de luz, tem a capacidade de atingir o sistema biológico alvo.

Por meio do processo chamado inativação fotodinâmica, micro-organismos podem ser mortos mediante a reações de fotossensitização. Os mecanismos de ação que executam a inativação fotodinâmica de patógenos não é parecido com os mecanismos dos antibióticos, pois um mesmo fotossensitizador pode ser usado contra vários micro-organismos de naturezas diferentes. As reações de fotossensitização produzem espécies reativas de oxigênio, que têm a capacidade de oxidar compostos orgânicos insaturados, como os lipídeos, os quais compõem a membrana celular das bactérias (PERUSSI, 2007).

Os fotossensibilizadores podem causar danos severos tanto ao DNA, quanto a membrana celular. Além disso, enzimas essenciais podem ser inviabilizadas (PINTON et al., 2012; PHOENIX et al., 2003). Os corantes fotossensíveis podem absorver luz em um comprimento de onda específico na presença de oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio, que são citotóxicas e capazes de promover a morte celular, tanto por necrose como por apoptose (PELEGRINO et al., 2005; MACHADO, 2000). O principal agente citotóxico é o oxigênio singlete, este é altamente reativo e é produzido durante os processos de fotossensitização (MACDONALD et al., 2001).

Na Figura 1 observa-se as estruturas dos corantes azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT), que são corantes fenotiazínicos, compostos azuis, catiônicos, com estrutura formada por um sistema planar de anéis aromáticos altamente conjugados. Devido a suas características estruturais, os fenotiazínicos são bons fotossensibilizadores, com intensa absorção na região visível do espectro eletromagnético (PERUSSI, 2007).

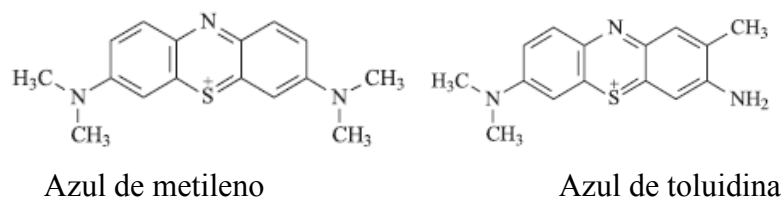


FIGURA 1. Estrutura química dos corantes azul de metileno e azul de toluidina (Fonte: PERUSSI, 2007)

Os monômeros têm absorção máxima em 664 nm, enquanto que os dímeros absorvem em 590 nm. Monômeros e dímeros podem estar envolvidos em diferentes tipos de reações fotoquímicas, que podem afetar o mecanismo de morte celular (TARDIVO et al.; 2005). Portanto, o espectro de absorção depende da concentração do corante, em altas concentrações, o azul de metileno tem tendência em formar dímero. Os monômeros do corante azul de metileno possuem absorção máxima em 664 nm (NEUMANN, 2000). O corante azul de toluidina apresenta melhor absorção no pico de 630 nm (HUNAG et al., 2010).

Para maximizar a terapia fotodinâmica espera-se que um fotossensibilizador reúna algumas características, tais como apresentar eficiência fotoquímica, ser biologicamente estável, provocar toxicidade mínima aos tecidos no escuro, ser de fácil eliminação, ser de fácil administração e ativação e ter ação localizada (ZHU; FINLAY, 2008). Esses corantes podem ser utilizados de forma segura no controle de fitobactérias, pois são usados em baixas concentrações, uma vez que nessas concentrações não são citotóxicos e nem causam danos às células humanas devido a sua rápida eliminação do organismo (NUNEZ et al., 2013).

A inativação de micro-organismos através da fotossensibilização era conhecida mesmo antes da segunda guerra mundial, momento em que a eficácia e as possíveis aplicações da terapia fotodinâmica foi demonstrada contra vírus, bactérias e

protozoários. Entretanto, devido ao advento do antibiótico a técnica foi abandonada. (PERUSSI, 2007).

Atualmente, muitas bactérias são resistentes aos antibióticos e aos produtos disponíveis no mercado para seu controle. A resistência de alguns micro-organismos pode ser natural ou adquirida. Os antibióticos, embora não sejam a única causa da resistência, podem ser capazes de selecionar em uma população os micro-organismos mais resistentes (SVENSATER; WELIN, 2001; MARTINEZ et al., 2009).

Dessa forma, a terapia fotodinâmica mostra-se como uma alternativa no controle de fitobactérias, pois não apresentam ação ou impacto no meio ambiente, podendo ser utilizada no tratamento de sementes para o controle de fitobactérias.

2.5 Nanopartículas

Estudos têm buscado o desenvolvimento de novas estratégias de controle, que possam fazer parte do manejo de doenças de forma eficiente. Uma alternativa que vem sendo incorporada recentemente no controle de patógenos é a nanotecnologia, que segundo Furlaneto (2011), compreende uma inovação na área tecnológica da agricultura, uma vez que o uso excessivo ou indevido dos agrotóxicos pode gerar problemas ambientais e a saúde humana.

A nanotecnologia é a habilidade de manipular átomos e moléculas individualmente para produzir materiais nanoestruturados e micro-objetos com aplicações no mundo real (MILLER, 2005). Os nanomateriais podem apresentar mudanças em algumas propriedades ópticas, magnéticas e elétricas. A capacidade de potencializar as propriedades físicas e químicas, levando a aplicações tecnológicas, é o grande diferencial dos materiais nanoestruturados (NOGUEIRA, 2013).

Diante do avanço desta ciência, vários nanomateriais têm sido utilizados com diferentes aplicabilidades e a nanotecnologia tem se destacado. Assim, estudos sobre a nanotecnologia vêm sendo desenvolvidos em áreas como a Química, Biologia, Eletrônica, Medicina e, mais recentemente, na Agricultura (RIBOLDI; PIMENTEL, 2009; FURLANETO, 2011).

Um problema grave na indústria alimentícia é a deterioração dos alimentos, entretanto, por meio de nanosensores é possível detectar patógenos nos alimentos usando uma nanopartícula que fluoresce em contato com determinado micro-organismo

(SOZER; KOKINI, 2009). A detecção de materiais tóxicos na atmosfera também pode ser feita por meio de nanosensores (SALAMANCA-BUENTELLO et al, 2005).

Por isso, um dos motivos do interesse na nanobiotecnologia é que essa ciência permite controlar o tamanho dos nanomateriais em escala nanométrica, sendo menor do que o diâmetro de muitas células humanas, o que facilita a entrada desses nanomateriais nas células, viabilizando a entrega de drogas (BHATTACHARYYA et al, 2009; RASMUSSEN et al, 2010). Sendo assim, nanopartículas com tamanhos inferiores a 100 nm apresentam elevada eficiência biocida, por permitir interações com as membranas microbianas e devido ao pequeno tamanho e a alta relação de superfície/volume (ALLAKER, 2010; MORONES et al, 2005).

Entre os vários óxidos de metais pesquisados, o óxido de zinco apresenta características altamente bactericidas, sendo capaz de combater tanto os patógenos, como seus esporos (SAWAI et al, 1996). Muitos estudos têm demonstrado que algumas nanopartículas feitas de óxidos de metais, como o ZnO, tem toxicidade seletiva para as bactérias e apresentam um efeito muito pequeno sobre as células humanas, o que torna interessante e promissor a sua utilização em indústrias agroalimentares (DANG et al., 2011). O ZnO em escala nanométrica é um bactericida que tem a capacidade de inibir tanto as bactérias Gram-positivas, como as Gram-negativas (KARUNAKARAN et al., 2011; FU et al., 2005).

O efeito bactericida de ZnO pode ser conferido devido à formação de espécies reativas de oxigênio na superfície do óxido de zinco (SAWAI; YOSHIKAWA, 2004); liberação de íons antimicrobianos, principalmente Zn^{2+} (KASEMETS et al., 2009; LI et al., 2011) ou contato direto de nanopartículas de ZnO com a parede celular da bactéria, levando a destruição da integridade da célula bacteriana (BRAYNER et al., 2006; ZHANG et al., 2007; ADAMS et al., 2006).

Agentes antibacterianos inorgânicos, tais como os óxidos metálicos são benéficos quando comparados com os compostos orgânicos, pois possuem maior estabilidade (SAWAI, 2003; SONDI; SONDI, 2004). Prata, cobre, selênio, dióxido de titânio e óxido de zinco são alguns exemplos de nanomateriais com capacidade de matar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos de modo natural (GRUMEZESCU, 2016).

A prata é um metal que apresenta acentuada capacidade antimicrobiana, tanto para bactérias, quanto para fungos, principalmente quando estão em nanopartículas (PAL et al, 2007; SAWAI; YOSHIKAWA, 2004; PANACEK et al, 2006). A prata não

é tóxica para as células humanas quando em baixa concentração (ZHANG et al, 2007; PAL et al, 2007).

Os mecanismos de ação da toxicidade de nanopartículas de prata sobre as bactérias, acontecem devido a liberação de íons Ag^+ , que exercem interação com os grupos tiol em proteínas bacterianas, prejudicando a replicação do seu DNA (MARINI et al, 2007) e produção de ATP, além de produção de espécies reativas de oxigênio por nanopartículas de prata e íons de prata e malefícios as membranas celulares pelas nanopartículas de prata (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010). O efeito bactericida da prata aumenta com a diminuição do tamanho da partícula devido a maior área superficial ocupada (ASADI, 2014).

Assim, por causa do uso exagerado de produtos químicos, as possíveis resistências adquiridas ou até mesmo bactérias resistentes às substâncias utilizadas no mercado, são essenciais estudos e pesquisas de formas alternativas e sustentáveis para o controle de fitobactérias.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**, New York, v. 40, p. 3527–3532, 2006.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 89, p. 1175–1186, 2010.
- ALVAREZ, A. M. Black rot of crucifers. In: SLUSARENKO, A.; FRASSER R. S. S.; VAN LOON, L. C (Ed.). Mechanisms of resistance of plant diseases. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, cap.1, p. 21-52, 2000.
- ALVAREZ, A. M.; CHO, J. J. Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 1456-1459, 1978.
- AMAR, S.; ECKE, W.; BECKER, H. C.; MÖLLERS, C. QTL for phytosterol and sinapate ester content in *Brassica napus* L. collocate with the two erucic acid genes. **Theoretical and Applied Genetics**, Göttingen, v.116, p. 1051–1061, 2008.
- ARIAS, R. S.; NELSON, S. C.; ALVAREZ, A. M. Effect of Soil-matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 109-116, 2000.
- ASADI, H. Effect of calcination temperature on antimicrobial properties of ZnO/Ag nanocomposite incorporated in architectural paints. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, [S.l.], v. 4, p. 315-319, 2014.
- ASSIS, S. M. P. et al. Antagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. **Revista de microbiologia**, São Paulo, v.30, p.191-195, 1999.
- BAIER, A. C.; ROMAN, E. S. Informações sobre a cultura da "canola" para o Sul do Brasil. In: Seminário Estadual De Pesquisa De Canola, v. 1, 1992, Cascavel. Passo Fundo: **EMBRAPA/CNPT**, p. 1-10, 1992.
- BHATTACHARYYA, D.; SINGH, S.; SATNALIKA, N.; KHANDELWAL, 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.
- BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, Washington v. 6, p. 866–870, 2006.
- CARMO, M. G. F.; CORREA, F. M.; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A. O.; ROSSETTO. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a

qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 579-584, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento safra brasileira de Grãos**, Safra 2016/17 - Décimo segundo levantamento, Brasília, v. 4, p. 1-158, set. 2017.

DANE, F.; SHAW, J. J. Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on host and non-host plants in the field environment. **Journal of Applied Bacteriology**, Chichester, v. 80, p. 73-80, 1996.

DANG, T. M. D.; LE, T. T. T.; BLANC, E. F.; DANG, M. C. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, [S.l.], v.2, p.1-6, 2011.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. Tratamento de sementes (controle de patógenos). UFV, Viçosa, p. 4-8, 1980.

DIAS, J. C. A. **Canola/Colza: Alternativa de inverno com perspectiva de produção de óleo comestível e energético**. Pelotas: Embrapa – CPATB, p. 46, 1992.

FERREIRA, S. F. **Tratamento fotodinâmico de sementes de tomate (*Solanum lycopersicon* MILL.), na inativação da bactéria *Xanthomonas* spp.** 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

FU, G.; VARY, P. S.; LIN, C. T. Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coatings. **Journal Physical Chemistry B**, Washington, v. 109, p. 8889–8898, 2005.

FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, São Bernardo do Campo, v. 8, 2011. Disponível em: <www.aptaregional.sp.gov.br>. Acesso em: 17 de jan. 2018.

GITAITIS, R.; WALCOTT, R. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.45, p.371-397, 2007.

GRIESBACH, E.; LOPTIEN, H.; MIERSCH, U. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Stuttgart, v. 110, p. 461-475, 2003.

GRIMALDI, R. **Adequação tecnológica para extração e refino do óleo de canola/colza**. 1994. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

GRONDEAU, C.; SAMSON, R. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. **Critical Review in Plant Sciences**, [S.l.], v. 13, p. 57-75, 1994.

GRUMEZESCU, A. M. **Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials**. cap. 2, p. 29, 2016.

HE, Y. W.; WU, J.; ZHOU, L.; YANG, F.; HE, Y. Q.; JIANG, B. L.; BAI, L.; XU, Y.; DENG, Z.; TANG, J. L.; ZHANG, L. H. *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, p. 948- 957, 2011.

HUANG, L.; HUANG, Y.; MROZ, P.; TEGOS, G. P.; ZHIYENTAYEV, T.; SHARMA, S. K.; LU, Z.; BALASUBRAMANIAN, T.; KRAYER, M.; RUZIÉ, C.; YANG, E.; KEE, H. L.; KIRMAIER, C.; DIERS, J. R.; BOCIAN, D. F.; HOLTEN, D.; LINDSEY, J. S.; HAMBLIN, M. R. Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins as Selective Antimicrobial Photosensitizers. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.54, p.3834-3841, 2010.

JENSEN, B. D.; VICENTE, J. G.; MANANDHAR, H. K.; ROBERTS, S. J. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 298-305, 2010.

KADO, C. I. Plant bacteriology. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, p. 226, 2010.

KARUNAKARAN, C.; RAJESWARI, V.; GOMATHISANKAR, P. Optical, electrical, photocatalytic, and bactericidal properties of microwave synthesized nanocrystalline AgZnO and ZnO. **Solid State Sciences**, Paris, v. 13, p. 923-928, 2011.

KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicol In Vitro**, Oxford, v. 23, p. 1116–1122, 2009.

KOCKS, C. G.; ZADOKS, J. C.; RUISSSEN, M. A. Spatio-temporal development of black rot (*X. campestris* pv. *campestris*) in cabbage in relation to initial inoculum levels in field plots in The Netherlands. **Plant Pathology**, Chichester, v. 48, p. 176-188, 1999.

KRAUTHAUSEN, H. J.; LAUN, N.; WOHANKA, W. Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 118, p. 7, 2011.

KUAN, T. L.; MINSAVAGE, G. V.; SCHAAD, N. W. Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected Brassica campestris. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 409-413, 1986.

LEE, Y. A.; SUNG, A. N.; LIU, T. F.; LEE, Y. S. Combination of chromogenic differential medium and estA-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, n.21, p.6831-6838, 2009.

- LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 45, p. 1977–1983, 2011.
- LUGO, A. J.; ELIBOX, W.; JONES, J. B.; RAMSUBHAG, A. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, p. 61-70, 2013.
- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, Chichester, v. 5, p. 105-129, 2001.
- MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 237-243, 2000.
- MACHADO, J. C. Benefícios da sanidade na qualidade de sementes. **Informativo – Abrates**, Londrina, v. 20, 2010.
- MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 12, p. 1531–1551, 2010.
- MARINGONI, A. C. Doenças das Crucíferas. In: KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. **Agronômica Ceres**, São Paulo, cap. 31, p. 285-291, 2005.
- MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, p. 191-194, 1994.
- MARINI, M.; NIEDERHAUSERN, N.; SEPPI, R. I.; BONDI, M.; SOBIA, C.; TOSELI, M.; PILATI, F. Antibacterial activity of plastics coated with silver doped organic – inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, p. 1246–1254, 2007.
- MARTINEZ, J. L., FAJARDO, A., GARMENDIA, L., HERNANDEZ, A., LINARES, J. F., SOLANO, L. M., SÁNCHEZ, M. B. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Review**. Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 44-65, Nov, 2009.
- MASSOMO, S. M. S.; MABAGALA, R. B.; SWAI, I. S.; HOCKENHULL, J.; MORTENSEN, C. N. Evaluation of varietal resistance in cabbage against the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Tanzania. **Crop Protection**, Guildford, v.23, p.315-325, 2004.
- MASSOMO, S. M. S.; NIELSEN, H.; MABAGALA, R. B.; GIESE, K. M.; HOCKENHULL, J.; MORTENSEN, C. N. Identification and characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 775-789, 2003.

MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. D. Avanços no Tratamento e recobrimento de sementes. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 52-69, 2010.

MILLER, JOHN C., SERRATO, R., KUNDAHL, G., The Handbook of Nanotechnology: Business, Policy and Intellectual Property Law. **First Edition**, New Jersey, Wiley, 2005.

MIRIK, M. SELCUK, F.; AYSAN, Y.; SAHIN, F. First outbreak of bacterial black rot on cabbage, broccoli, and Brussels sprouts caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the Mediterranean Region of Turkey. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 176-176, 2008.

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, v.16, p. 2346–2353, 2005.

MORRISON, M. J.; McVETTY, P. B. E.; SHAYKEWICH, C. F. The determination and verification of a baseline temperature for the growth of westar Summer rape. **Canadian Journal Plant Science**, Ontário, v. 69, p. 455-464, 1989.

NANDA, P.; BHARGAVA, S. C.; RAWSON, H. M. Effect of sowing date on rates of leaf appearance, final leaf numbers and áreas em *Brassica campestris*, *B. Juncea*, *B. Napus* and *Carinata*. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 42, p. 125-134, 1995.

NEUMANN, M. G., GESSNER, F., CIONE, A. P. P., SARTORI, R. A., CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, 2000.

NOGUEIRA, N. A. S. **Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de NiFe₂O₄ produzidas via método sol-gel proteico**, 2013, 110 f., Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Materiais) Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2013.

NUNEZ, S. C., RIBEIRO, M. S., GARCEZ, A. S. **PDT – Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 312, 2013.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 1712–1720, 2007

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 110, p. 16248– 16253, 2006.

PELEGRINO, A. C.; CAROLINA, M. M.; GOTARDO, F. A.; SIMIONI, A. R.; ASSIS, M. D.; TEDESCO, A. C. Photophysical properties of crowned porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 81, p. 771-776, 2005.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 988-994, 2007.

PESKE, S.T; BARROS, A. C. S. A. Produção de sementes. In: PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.; ROTA, G. (Ed.) Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. Pelotas: **UFPel**. p. 12-91, 2003.

PHOENIX, D. A., SAYED, Z., HUSSAIN, S., HARRIS, F., WAINWRIGHT, M. The phototoxicity of phenotiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, UK, v. 39, p. 17-22, 2003.

PINTON, P. C., ROSSI, M. T., SALA, R., VENTURINI, M. Photodynamic Antifungal Chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 88, p. 512-522, 2012.

POPLAWSKY, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5123-5127, 2000.

POPOVIĆ, T.; BALAZ, J.; STAROVIC, M.; TRKULJA, N.; IVANOVIC, Z.; IGNJATOV, M.; JOSIC, D. First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent of black rot on oilseed rape (*Brassica napus*) in Serbia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, p. 418-418, 2013.

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.

RIBOLDI, B. M.; PIMENTEL, J. R. **Nanotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. 5º Congresso de extensão universitária da UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Águas de Lindoia, 2009.

ROBERTS, S. J.; HILTUNEN, L. H.; HUNTER, P. J.; BROUGH, J. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica transplants: effects of dose and watering regime. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 879- 889, 1999.

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

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 v. 2, p. 383-386, 2005.

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 803-809, 2004.

- SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 177–182, 2003.
- 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, v. 29, p. 627–633, 1996.
- SCHAAD, N. W. Detection of Seedborne Bacterial Plant Pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, p. 885-890, 1982.
- SCHAAD, N. W. DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 1215-1220, 1981.
- SCHAAD, N. W.; THAVEECHAI, N. Black rot of crucifers in Thailand. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 1231-1234, 1983.
- SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 1518-1520, 1974.
- SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of plant Pathogenic Bacteria, **APS Press**, St. Paul 3 ed., p.385, 2001.
- SCHULTZ, T.; GABRIELSON, R. L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in western Washington crucifer seed fields: Occurrence and survival. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 1306-1309, 1986.
- SIQUEIRA, C.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CORDEIRO, C.M.T. **EMBRAPA**: Índice de doenças de hortaliças no Brasil: bactérias e fungos, 2 ed. Brasília/DF: CNPH. 1997. cap 10, p.89-85, 1985.
- SONDI, I., SONDI, S. B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 275, p. 177–182, 2004.
- SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.27, p. 82-89, 2009.
- STARR, M. P.; STEPHENS, W. L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 87, p. 293-302, 1964.
- SVENSATER, G., WELIN, J., WILKINS, J. C., BEIGHTON, D., HAMILTON, I. R. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam v. 205, p. 139-146, 2001.
- TARDIVO, J. P., GIGLIO, A. D., OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TABA, D. B., SEVERINO, D., TURCHIELLO, R. F., BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basics mechanisms

to clinical applications. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, Amsterdam, v. 2, p. 175-191, 2005.

TEBALDI, N.D.; PANIZZI, R.C. SADER, R. Detecção, Transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica das sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p. 290-293, 2007.

THOMAS, P. **Canola grower's manual**. Winnipeg: Canola Council of Canada, 2003. Disponível em: <http://www.canolacouncil.org/crop-production/canola-grower's-manual-contents/> Acesso em: 20/09/2017.

TIMMER, L. W.; MAROIS, J. J.; ACHOR, D. Growth and survival of xanthomonads under conditions nonconducive to disease development. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 1341-1345, 1987.

TOMM, G. O. **Canola e girassol: opções de cultivo para o Brasil**. 2015. Disponível em: http://www.focorural.com/detalhes/n/n/6394/Canola_e_girassol:_opcoes_de_cultivo_para_o_Brasil.html. Acesso em: 17 jan. 2018.

TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. 2007. Sistemas de Produção online. 2007. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf. Acesso em: 20 de setembro, 2017.

TOMM, G. O.; FERREIRA, P. E. P.; AGUIAR, J. L. P. de.; CASTRO, A.; M. G. de; LIMA, S. M. V.; DE MORI, C. **Panorama atual e indicações para aumento de eficiência da produção de canola no Brasil**. Embrapa Trigo: Documentos Online 118, p.27, Passo Fundo, RS, 2009. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do118.htm.

UNITED STATES. Department of Agriculture. **Economic Reserch Service**. Canola. 2016. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/canola>. Acesso em: 20 setembro, 2017.

VAN DER WOLF, J. M.; VAN DER ZOUWEN, P. S. Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, p. 726-732, 2010.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 45, p. 472-489, 1995.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to Brassica crops. **Molecular plant pathology**, Chichester, v. 14, p. 2-18, 2013.

VILLETH, G. R. REIS, F. B.; TONIETTO, A.; HUERGO, L.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Comparative proteome analysis of

Xanthomonas campestris pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.298, p. 260-266, 2009.

WILLIAMS, P. H. Black rot. In: RIMMER, S.R.; SHATTUCK, V.I.; BUCHWALDT, L. (Ed.). Compendium of brassica diseases. **APS Press**, Saint Paul, p. 60-62, 2007.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 736–742, 1980.

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**, Dordrecht, v. 9, p. 479–489, 2007.

ZHU, T.C.; FINLAY, J.C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, New York, v.35, p.3127-3136, 2008

CAPÍTULO 1: Terapia fotodinâmica no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro e no tratamento de sementes de canola naturalmente contaminadas

RESUMO

A cultura da canola (*B. napus*) foi recentemente introduzida na região do Triângulo Mineiro e Alta Paranaíba, MG. A podridão negra causada pela bactéria Xcc é uma das principais doenças da cultura. A bactéria é disseminada pelas sementes e, por isso métodos alternativos de controle devem ser avaliados. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da terapia fotodinâmica, com o uso dos corantes Azul de Metileno e Azul de Toluidina, associados à irradiação, no controle de Xcc *in vitro* e em sementes de canola naturalmente contaminadas. A suspensão bacteriana de Xcc foi tratada com os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e associação deles nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, avaliando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Sementes de três genótipos de canola foram tratadas com NaCl 0,85% (Testemunha), Azul de Metileno, Azul de Toluidina e Azul de Toluidina + Azul de Metileno nas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, com e sem irradiação. Foi avaliada a porcentagem de germinação das sementes, índice de velocidade de emergência, porcentagem de emergência de plântulas, detecção da bactéria nas sementes e o teste de sanidade de sementes (*Blotter test*). Os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a associação deles nas concentrações 100, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, quando submetidos à irradiação foram eficazes no controle de Xcc *in vitro*. No entanto, não foi possível estimar o efetivo controle da bactéria nas sementes, devido à baixa taxa de infecção das mesmas. O tratamento das sementes com os corantes reduziu a qualidade fisiológica das sementes. Ensaios deverão ser conduzidos para avaliar diferentes concentrações dos corantes no controle da bactéria em sementes de canola, visto que as concentrações utilizadas apresentaram toxicidade às sementes.

Palavras-chave: Azul de metileno, Azul de toluidina, *B. napus*, inativação de micro-organismos, tratamento de sementes.

CHAPTER 1: Photodynamic therapy in the control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *in vitro* and naturally contaminated canola seeds

ABSTRACT

Canola (*B. napus*) was recently introduced in the regions of Triângulo Mineiro and Alta Paranaíba, MG. One of the most important pathogen associated with this crop is Xcc, causal agent of Black rot. The bacterium is disseminated by seeds and alternative control methods should be evaluated. Therefore, the objective of this work was to evaluate the photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue dyes associated with irradiation in the control of Xcc *in vitro* and naturally contaminated canola seeds. The bacterial suspension of Xcc was treated with Methylene Blue, Toluidine Blue and their association at concentrations 25, 50 and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and the colony-forming units (CFU) was evaluated. Seeds of three canola genotypes were also treated with 0.85%NaCl (non-treated), Methylene Blue, Toluidine Blue and Toluidine Blue+Methylene Blue at concentrations 100, 50 and 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, in the presence and absence of irradiation. Seed germination percentage, emergence speed rate, seedling emergence percentage, seed bacteria detection and seed health test (Blotter Test) were evaluated. Methylene Blue, Toluidine Blue dyes and their association at concentrations 100, 50 and 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, were effective in Xcc control *in vitro* under irradiation. However, it was not possible to estimate the control effectiveness of the bacteria in the seeds due to low pathogen infection rate. Seed treatment with the dyes reduced the physiological seed quality. Trials should be done to evaluate different concentrations of dyes in the control of canola seed bacteria, because this work has showed toxicity to the seeds.

Keywords: Methylene blue, Toluidine blue, *B. napus*, inactivation of microorganisms, seed treatment.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da canola destaca-se como a terceira oleaginosa mais cultivada no mundo (TOMM, 2015). A produção dessa brássica tem grande importância para a extração de óleo comestível, produção de biodiesel e extração de farelo para produção de ração animal (TOMM, 2007).

A podridão negra, causada pela bactéria *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc), é uma doença prejudicial as brássicas, ocasionando em perdas de produtividade e na qualidade dos produtos (VILLETH et al., 2009). A bactéria é disseminada pelas sementes, podendo ser introduzida em novas áreas de cultivo, levando a ocorrência de epidemias. O controle químico não é eficiente (ROMEIRO, 2005) e, por isso, sementes livres do patógeno devem ser utilizadas.

Medidas alternativas de controle de patógenos nas sementes devem ser avaliadas, como o uso da terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica consiste na associação de um corante sensível à luz, o fotossensibilizador ativado em um comprimento de onda específico. Após exposição microbiana a esta energia luminosa, o fotossensibilizador é energizado e pode provocar a formação de espécies reativas de oxigênio, sendo estas responsáveis pela inativação de micro-organismos (DENIS et al., 2011).

Os mecanismos de ação da inativação fotodinâmica de patógenos é diferente dos mecanismos dos antibióticos, pois um mesmo fotossensibilizador pode ser usado contra vários micro-organismos. As reações de fotossensibilização produzem espécies reativas de oxigênio, que tem a capacidade de oxidar compostos orgânicos insaturados, como os lipídeos que compõe a parede celular bacteriana (PERUSSI, 2007). Os fotossensibilizadores podem causar danos severos tanto ao DNA quanto a membrana celular, além de inativarem enzimas essenciais ao patógeno (PINTON et al., 2012; PHOENIX et al., 2003).

O uso dos corantes azul de metileno e azul de toluidina foram avaliados no tratamento de sementes de tomate, no controle de *Xanthomonas* spp. (FERREIRA, 2012).

Atualmente, muitas bactérias são resistentes aos produtos disponíveis no mercado para seu controle. Diante disso, se faz necessário a utilização de formas alternativas de controle de bactérias.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso da terapia fotodinâmica no controle de Xcc *in vitro* e em sementes de canola. Os objetivos específicos foram

avaliar o uso de corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a combinação deles, irradiados ou não no controle de Xcc *in vitro*, além de avaliar o uso de corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a combinação deles, irradiados ou não, no tratamento de sementes de canola para o controle de Xcc.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, no Laboratório de Sementes e em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - MG, no período de junho a setembro de 2017.

2.1 Preparo da suspensão bacteriana

O isolado UFU F64 de Xcc pertencente à coleção de bactérias do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto de Ciências Agrárias, da UFU e foi cultivado em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970).

A suspensão bacteriana foi preparada em NaCl (0,45%) e ajustada em espectrofotômetro ($OD_{550}=0,5$) para a concentração de 1×10^9 UFC mL⁻¹ (MARCUIZZO et al., 2009).

2.2 Terapia fotodinâmica no controle de Xcc *in vitro*

Para a inativação da suspensão bacteriana utilizou-se a combinação de corantes em diferentes concentrações, sendo submetidos à irradiação ou não (escuro).

Os corantes Azul de Metileno (AM), Azul de toluidina (AT) e a associação destes (1:1), foram preparados nas concentrações 25, 50 e 100 µmol L⁻¹, em solução de NaCl (0,45%) e autoclavados, por 30 min a 120 °C. Como testemunha foi utilizada a solução de NaCl (0,45%).

Em microtubos colocou-se 100 µL da suspensão bacteriana e 900 µL dos corantes para cada tratamento. Todos os microtubos foram recobertos com papel alumínio para a proteção contra a luminosidade e incubados em estufa a 28 °C por 20 min. Posteriormente, parte dos microtubos foram irradiados a 5cm de distância da fonte de iluminação no equipamento AMS-II (Sistema de LED de alta potência, emissão 652nm) por 20 minutos. Os demais microtubos foram mantidos no escuro em temperatura ambiente.

Em seguida a suspensão bacteriana foi diluída em série (10^{-2} a 10^{-7}) e cultivada em meio de cultura 523. Avaliou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) pela contagem de colônias formadas.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com três repetições e em um arranjo fatorial 3 x 3 x 2 + 2 (corantes x concentrações x luminosidade + adicionais).

2.3 Terapia fotodinâmica no tratamento de sementes de canola

As sementes dos genótipos de canola Terola 10A40 (Serra do Salitre-MG, 2014), Hyola 61 (Área experimental Rio Grande do Sul, 2014) e Terola 10A40 (Área experimental-MT, 2013) naturalmente contaminadas com Xcc, foram tratadas com os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e associação de Azul de Metileno + Azul de Toluidina nas concentrações 100, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Como testemunha as sementes foram tratadas NaCl 0,45%. As sementes foram irradiadas com luz de LED descrita anteriormente, ou não (escuro).

As sementes de cada genótipo (800 sementes) foram colocadas em placas de Petri, e adicionado 20 mL de cada corante ou NaCl 0,85% (testemunha) e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 20 minutos. Posteriormente, as sementes foram irradiadas e colocadas a 5 cm de distância da fonte de iluminação (Equipamento AMS-II, sistema de LED de alta potência, emissão 652nm) por 20 minutos. As sementes não irradiadas foram mantidas no escuro em temperatura ambiente (25 °C).

2.3.1 Detecção de Xcc em sementes de canola

Para a detecção de Xcc em sementes de canola, foram utilizadas 200 sementes com oito repetições para cada genótipo de sementes tratadas ou não, irradiadas ou não. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4 x 2 (corantes x luminosidade).

As sementes de canola foram colocadas sobre o meio de cultura semi-seletivo NSCAA (SCHAAD et al., 2001) em placas de Petri, e incubadas em estufa a 28 °C por 72 horas. Após este período, avaliou-se o número de sementes com a presença de Xcc, determinando a porcentagem de sementes contaminadas.

2.3.2 Teste de sanidade de sementes de canola

A qualidade sanitária das sementes de canola foi avaliada pelo método papel filtro “blotter test”. Para tanto, utilizou-se 200 sementes de cada tratamento, sendo estas distribuídas em quatro caixas plásticas tipo “gerbox” com 50 sementes cada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4 x 2 (corantes x luminosidade).

As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel mata borrão, em “gerbox”. O papel foi embebido com água, equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Posteriormente, os “gerbox” foram levados para BOD a temperatura de 20 °C ±1 (BRASIL, 2009). Após sete dias de incubação foram identificados os fungos presentes nas sementes, com auxílio do microscópio estereoscópio, e a porcentagem de incidência dos fungos nas sementes foi calculada.

2.3.3 Teste padrão de germinação das sementes de canola

O teste padrão de germinação foi realizado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), utilizando 200 sementes para cada tratamento. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes cada, em um arranjo fatorial 4 x 2 (corantes x luminosidade).

As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel mata borrão, em “gerbox”. O papel foi embebido com água, equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. As sementes foram levadas ao germinador à temperatura de 20-30 °C ±2, com fotoperíodo de 8 h luz/16 h escuro (BRASIL, 2009).

As avaliações foram realizadas pela contagem de plântulas normais emergidas, sendo a primeira e a última contagem, no quinto e sétimo dia, respectivamente. Os resultados foram expressos em % de germinação, conforme critérios estabelecidos pela RAS (BRASIL, 2009).

2.3.4 Índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas

O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando-se 200 sementes, com quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram semeadas em bandejas descartáveis de isopor (25 cm x 20 cm) contendo areia. O experimento foi conduzido

em delineamento de blocos casualizados, em um arranjo fatorial 4 x 2 (corantes x luminosidade).

A contagem de plântulas (cotilédones visíveis) ocorreu diariamente, a partir do segundo dia até o nono dia após a semeadura. Ao final das avaliações com o número de plântulas emergidas, calculou-se o índice de velocidade de emergência (IVE) pela fórmula (MAGUIRE, 1962):

$$IVE = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$$

Onde:

G: número de plântulas normais emergidas, a cada avaliação;

N: número de dias após a semeadura.

A emergência de plântulas foi avaliada pelo número de sementes emergidas no nono dia após a semeadura, calculando-se a porcentagem de plântulas emergidas.

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de pressuposições, teste de normalidade (Shapiro Wilk), homogeneidade (Levene) e aditividade, sendo o último utilizado apenas para experimento em delineamento em blocos casualizados, pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM CORP, 2011).

Quando necessário, os dados foram transformados em $\log x+1$ ou $\sqrt{x+1}$ para atender as pressuposições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Dunnet a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR versão 5.30 (FERREIRA, 2010) e Assistat versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Terapia fotodinâmica no controle de *Xcc in vitro*

Analisando os dados referentes a esta variável, observamos que houve interação tripla significativa entre os fatores ($P>0,05$) pelo Teste de Tukey. Os tratamentos com a suspensão bacteriana nas três concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos corantes azul de metileno (AM), azul de toluidina (AT) e a mistura de ambos (AM+AT) (Tabela 1), quando não irradiado (escuro), proporcionaram o crescimento da bactéria em meio de cultura, ou seja, estes tratamentos não erradicaram a bactéria. No entanto, quando a suspensão bacteriana foi irradiada com o uso dos corantes AM+AT nas três concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), houve eliminação total das células bacterianas, assim como, a concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os dois corantes isolados e a concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do corante AT.

Somente a combinação entre corantes (AM+AT) nas três diferentes concentrações, quando irradiado, inibiu o crescimento da bactéria, demonstrando que a interação entre os corantes apresentou efeito potencializado.

TABELA 1. Corantes fotodinâmicos no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris in vitro* (UFC mL^{-1}). Uberlândia - MG, 2017. (Fonte: BAUTE, 2017)

| Número de unidades formadoras de colônia mL ⁻¹ | | | | | | | |
|---|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| Corantes | Concentrações μmol L ⁻¹ | | | | | | |
| | 0 | 25 | | 50 | | 100 | |
| | | Escuro | Irradiado | Escuro | Irradiado | Escuro | Irradiado |
| | | | | | | | |
| AM | | 2,7x10 ⁸ aA+ | 2,7x10 ⁵ aA+ | 2,7 x10 ⁸ aA+ | 2,5 x10 ⁹ aA+ | 2,0 x10 ⁸ aA+ | 0,0aA+ |
| AT | | 1,0x10 ⁹ bB* | 3,8 x10 ⁵ aA+ | 8,0 x10 ⁸ bB* | 0,0aA+ | 2,6x10 ⁹ bC*+ | 0,0aA+ |
| AM+AT | | 2,0 x10 ⁸ aA+ | 0,0aA+ | 1,0 x10 ⁸ aA+ | 0,0aA+ | 1,3 x10 ⁸ aA+ | 0,0aA+ |
| Test. E | 1,233 x10 ⁹ | | | | | | |
| Test. I | 1,83 x 10 ⁵ | | | | | | |
| CV% | 78,16 | | | | | | |

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

*Test I e +Test E: médias comparadas a testemunha são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância. AM: Azul de Metileno; AT: Azul de Toluidina; I: irradiado; E: escuro; Test: Testemunha.

Hussain et al. (2006), demonstraram a eficácia dos corantes AM e AT contra *Escherichia coli*, embora não tenham determinado os mecanismos de ação dos corantes de maneira precisa. Já o experimento de De Paula (2010), constatou que o corante AM,

em concentrações em torno de $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$, foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *Staphylococcus aureus in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos por Ferreira (2012), os corantes AM e AT foram eficazes como agentes fotossensibilizadores na inativação da bactéria *Xanthomonas* spp. com capacidade de erradicar completamente o crescimento bacteriano. Contudo, quando os corantes foram associados apresentaram maior efeito tóxico sobre a bactéria, sendo necessária uma menor concentração do produto.

Longo e Azevedo (2010) encontraram resultados semelhantes a este trabalho, em estudos com *E. coli*, o tratamento AM isolado nas concentrações 25 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentou efeito bactericida. Em contrapartida, a combinação deste corante com irradiação a laser promoveu redução significativa do número de colônias. Tal resultado mostra que para o sucesso da terapia fotodinâmica é necessário à junção dos fatores: luz e agente fotossensibilizador.

Os corantes fotossensíveis absorvem a luz em um específico comprimento de onda, o oxigênio presente é transformado para o estado excitado tripleto, reagindo com o substrato local (REAÇÃO I), formando radicais citotóxicos (REAÇÃO II) para a produção do oxigênio singlete citotóxico, reagindo com a parede celular, ácidos nucleicos, peptídeos, lipídeos, proteínas, etc. As reações que causam os piores danos fotooxidativo aos patógenos são a do tipo II (DONNELLY *et al.*, 2008).

Corantes fotossensíveis absorvem luz em um comprimento de onda específico na presença de oxigênio resultando em espécies reativas de oxigênio, que são citotóxicas e capazes de promover a morte celular por apoptose ou necrose (PELEGRINO *et al.*, 2005; MACHADO, 2000). Esses corantes possuem a capacidade de passar pela membrana celular por canais de proteínas presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas (USACHEVA *et al.*, 2001).

O corante AM possui afinidade por proteínas da parede celular e membrana bacteriana (USACHEVA *et al.*, 2008). O AT liga-se aos polifosfatos da membrana externa, sendo capaz de produzir danos moleculares para proteínas e lipídeos e também ao mesossomo (geração de energia). Sendo assim, esse corante é considerado um excelente destruidor da membrana pela sua ação fotodinâmica (USACHEVA *et al.*, 2001).

O crescimento da bactéria Xcc em meio de cultura, após os tratamentos com os corantes AM, AT e AM+AT, nas diferentes concentrações 25, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$,

quando não irradiado ou no escuro, pode ser observado na Figura 1, e quando irradiado na Figura 2.

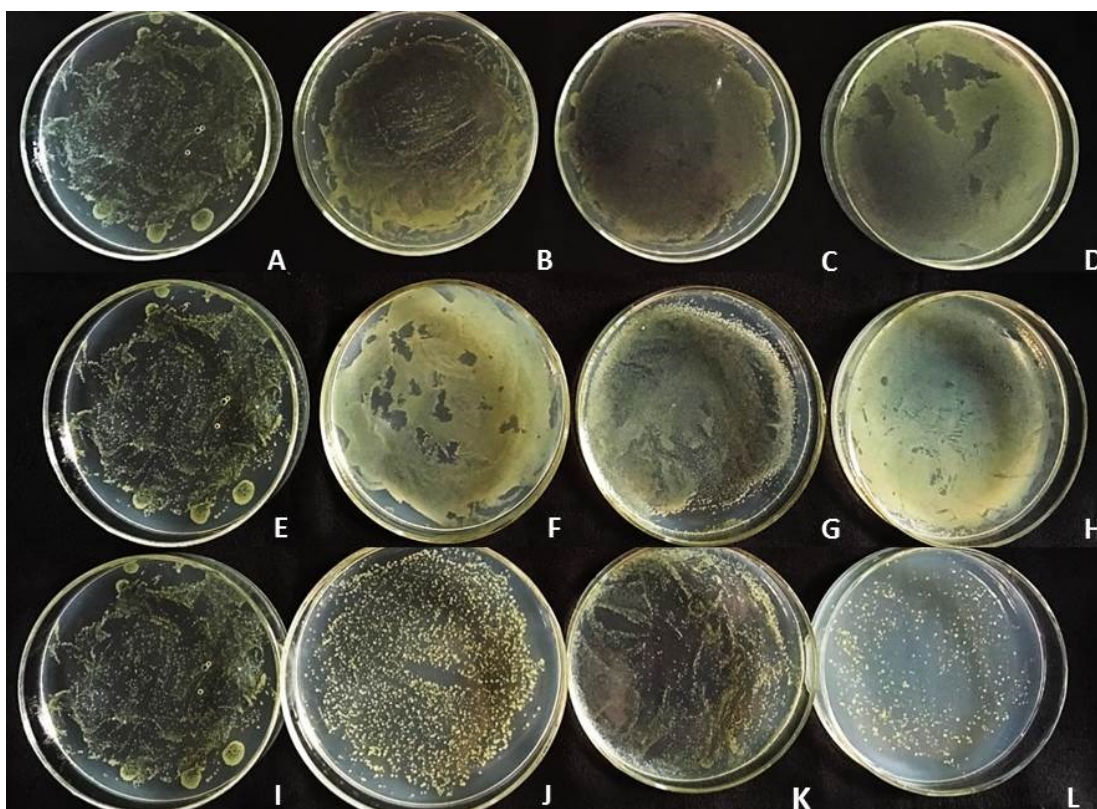


FIGURA 1. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em meio de cultura, tratadas com os corantes Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina (AT) e Azul de Metileno+Azul de Toluidina em diferentes concentrações, sob escuro. A. Testemunha; B. AM (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); C. AM (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); D. AM (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); E. Testemunha; F. AT (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); G. AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); H. AT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); I. Testemunha; J. AM+AT (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); K. AM+AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); L. AM+AT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fonte: BAUTE, 2017.

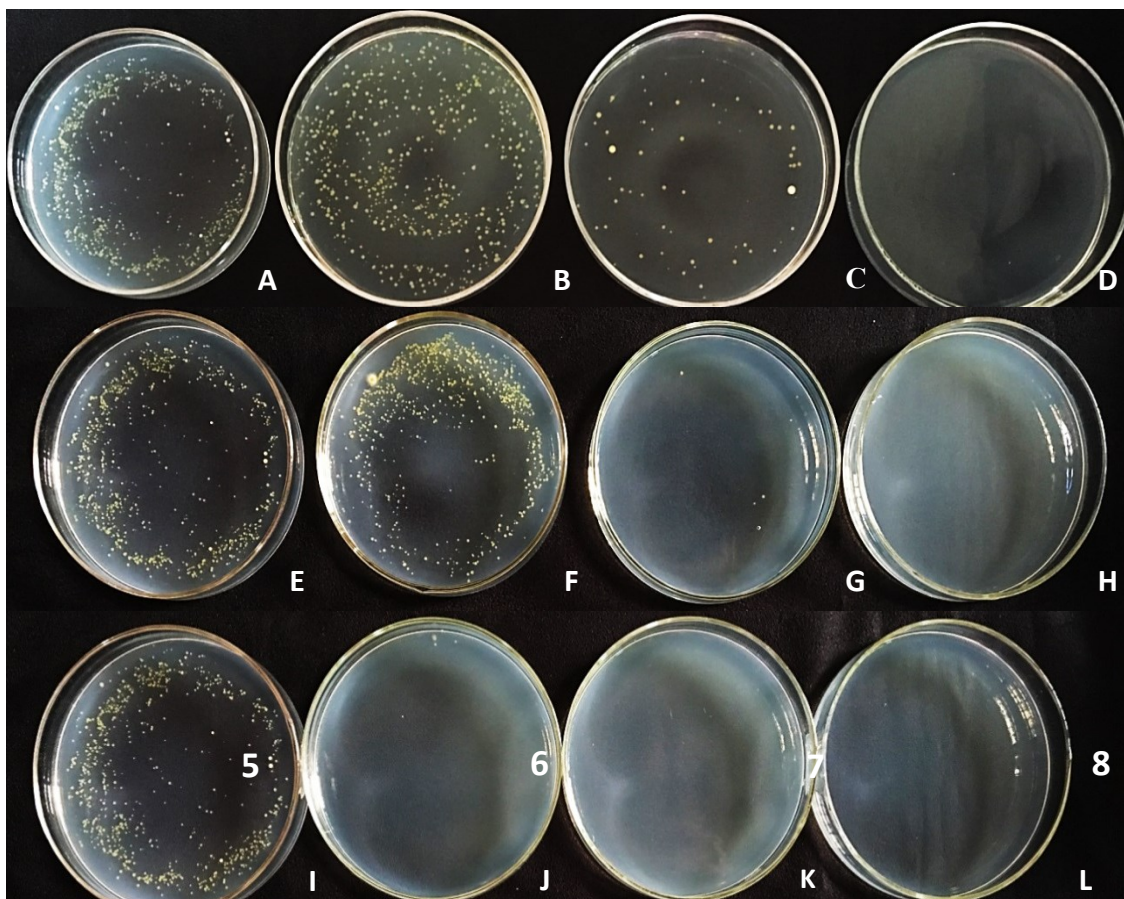


FIGURA 2. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em meio de cultura, tratadas com os corantes Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina (AT) e Azul de Metileno+Azul de Toluidina em diferentes concentrações, sob irradiação. A. Testemunha; B. AM (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); C. AM (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); D. AM (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); E. Testemunha; F. AT (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); G. AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); H. AT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); I. Testemunha; J. AM+AT (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$); K. AM+AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$); L. AM+AT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Fonte: BAUTE, 2017.

3.2 Terapia fotodinâmica no tratamento de sementes de canola

3.2.1 Detecção de *Xcc* e sanidade de sementes de canola

Nas sementes de canola dos genótipos Terola 10A40 (2014), Hyola 61(2014) e Terola 10A40 (2013) tratadas com AM (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), AM+AT (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e sem tratamento (Testemunha), não foi detectada a presença de *Xcc*, provavelmente devido à baixa taxa de infecção da bactéria nas sementes.

A quantidade de inóculo transmitido por sementes no desenvolvimento de doenças é provavelmente devido a densidade de inóculo presente nas sementes (HIRANO e UPPER, 1983; NESMITH, 1983). Sobre a quantidade de inóculo presente

nas sementes ressalvas são importantes: a superfície das sementes pode abrigar diversos patógenos, sendo que estes podem mascarar resultados importantes; a percentagem de sementes com fitobactérias é muito pequena, quase sempre menos que 1% do lote (MILUS e MIRLOHI, 1995; MOURA e ROMEIRO, 1993; ROMEIRO et al., 1998; SAETTLER et al., 1989; SCHAAD, 1983).

Sementes de tomate inoculadas com *Xanthomonas* spp. apresentaram controle de até 100% da bactéria quando tratadas com a associação dos corantes AM e AT, na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FERREIRA, 2012).

Na análise de sanidade das sementes de canola tratadas como os corantes e não irradiada, foi observado a incidência de 31% de *Aspergillus* sp. no genótipo Terola 10A40 (Serra do Salitre) tratada com o corante Azul de Toluidina (AT) (Figura 3). A incidência dos fungos *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. e *Alternaria* sp. variou de 0,5 a 5%. A ocorrência de *Alternaria* sp. foi observada somente no genótipo Terola 10A40 (Serra de Salitre).

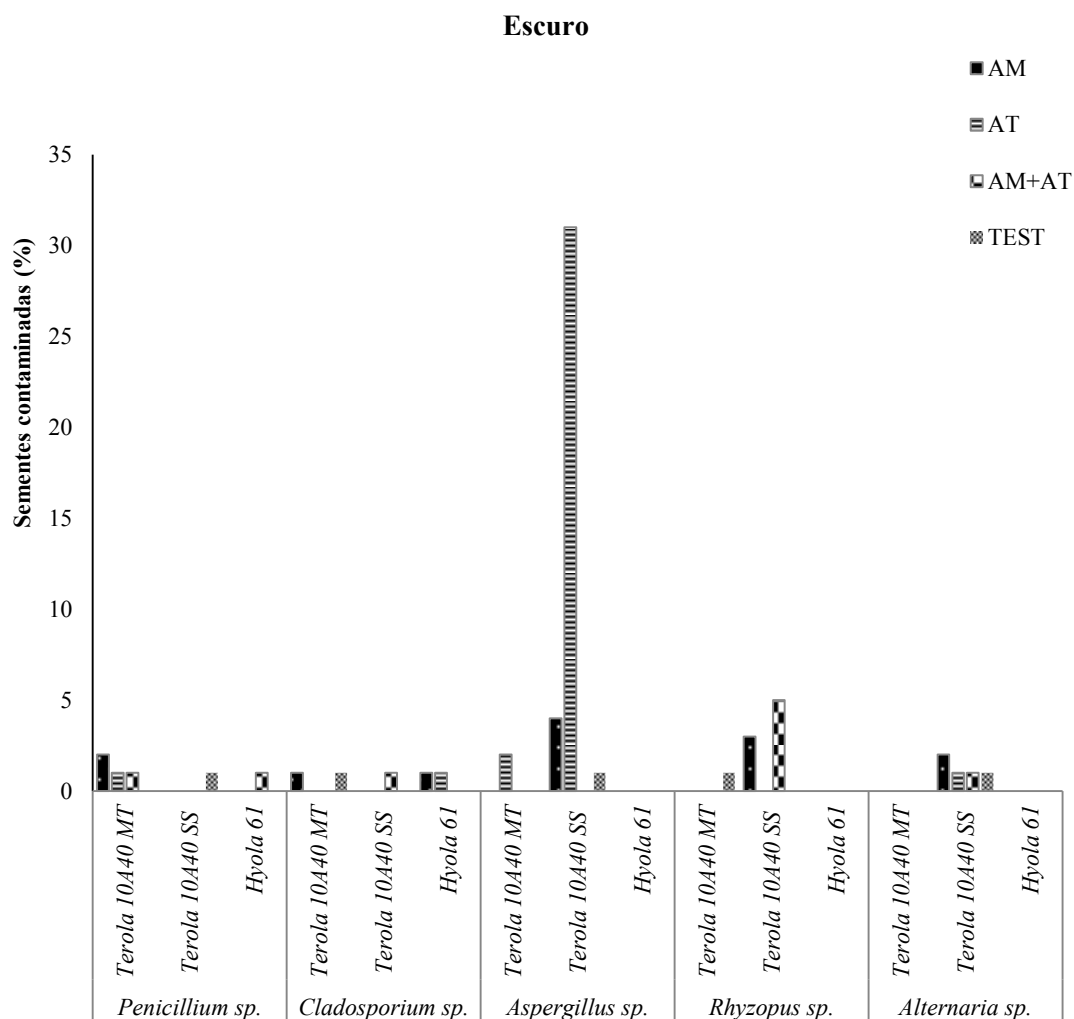


FIGURA 3. Incidência de fungos em sementes de diferentes genótipos de canola, tratadas com diferentes corantes, em condições de escuro. Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina (AT) e Testemunha (Test). Uberlândia – MG, 2017.

Na sanidade das sementes de canola tratadas com os corantes (Figura 4) e irradiada, foi observada a incidência dos fungos *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Phoma sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.* e *Rhizopus sp.*, nos tratamentos Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina (AT) e na combinação entre ambos AM+AT.

Apesar de não poder afirmar que houve controle dos patógenos com os corantes, devido a oscilação entre patógeno e tratamentos, podemos chamar atenção para o fungo *Alternaria sp.*: no momento em que as sementes tratadas foram irradiadas, estas apresentaram controle deste fungo, quando comparado com o tratamento escuro.

Irradiado

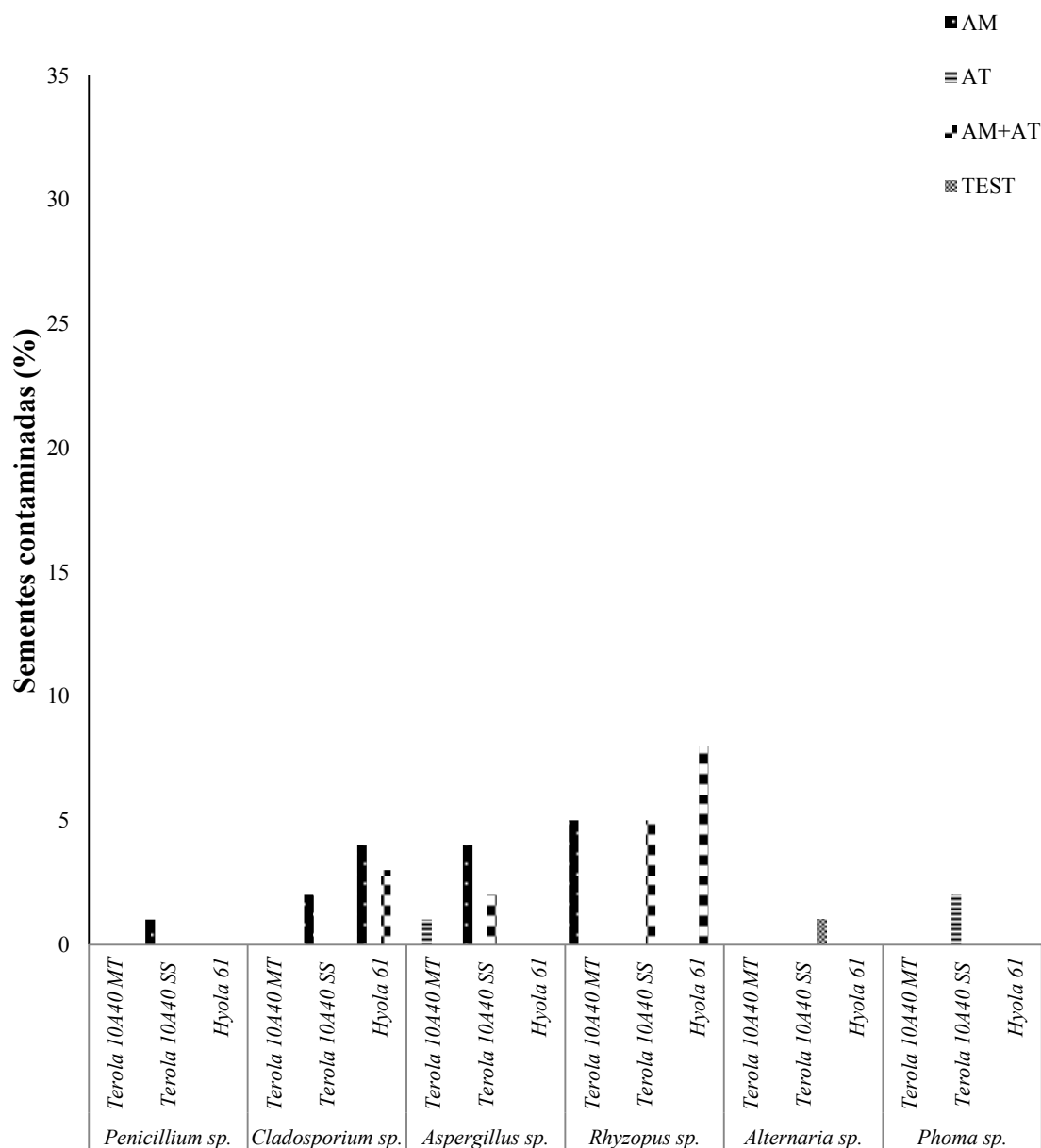


FIGURA 4. Incidência de fungos em sementes de diferentes genótipos de canola, tratadas com diferentes corantes, submetidas a irradiação. Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina (AT) e Testemunha (Test). Uberlândia – MG, 2017.

A alternariose é considerada uma das principais doenças que ocorre em Brássicas. Sementes infectadas com este patógeno podem ser completamente destruídas, ocasionando em queda na germinação das sementes e transmissão para as plântulas, causando necrose nos cotilédones e hipocótilos, evoluindo a tombamento e morte (MIGLIORINI, 2014).

A cultura da canola requer diversas práticas de manejo, mas é imprescindível sementes e restos culturais livres de doenças como a canela preta (*Leptosphaeria maculans/Phoma lingam*), que é considerada uma importante doença na cultura, devido aos grandes prejuízos causados (TOMM et al., 2009).

O tratamento das sementes dos diferentes genótipos de canola com os diferentes corantes, irradiadas ou não, demonstram que não houve diferença na incidência de fungos, exceto para *Phoma* sp. sob irradiação. Em ambas as condições foram observados fungos de armazenamento e alguns dos principais fungos em sementes de canola (*Alternaria* sp. e *Phoma* sp.).

3.2.2 Germinação, índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas de sementes de canola

Para a porcentagem de germinação de sementes de diferentes genótipos de canola, tratadas com diferentes corantes, irradiadas ou não, observa-se que houve interação significativa ($P > 0.05$) entre o genótipo Terola 10A40 SS, nos respectivos corantes e, no genótipo Terola 10A40 MT, nos corantes e sob irradiação. Por outro lado, no genótipo Hyola 61 não houve interação significativa ($P < 0.05$) em nenhuma variável (Tabela 2).

No genótipo Terola 10A40 SS, as maiores porcentagens de germinação foram observadas no tratamento Testemunha e AM+AT ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$) com 80 e 77%, respectivamente, enquanto que a menor germinação foi 64%, no tratamento AM ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 2).

Para o genótipo Terola 10A40 MT, somente o tratamento AM ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na condição escuro se diferenciou dos demais tratamentos, apresentando porcentagem de germinação de sementes de 78%. Todos os demais tratamentos nas condições de escuro e irradiado obtiveram valores acima de 89% na variável germinação (Tabela 2).

TABELA 2. Porcentagem de germinação de sementes, de diferentes genótipos de canola, tratadas com diferentes corantes, irradiadas ou não. Uberlândia - MG, 2017.

| Porcentagem de germinação de sementes de canola | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------|
| Corantes | Terola 10A40 SS | Terola 10A40 MT | |
| | | Escuro | Irradiado |
| AM 100 | 64c | 78bB | 89aA |
| AM+AT 25 | 77ab | 96aA | 96aA |
| AT 50 | 70bc | 93aA | 91aA |
| TEST | 80 ^a | 92aA | 89aA |
| CV(%) | 12,51 | 7,56 | |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. AM: Azul de Metileno; AT: Azul de Toluidina.

O uso de AM ou de AT, tanto sob ação da luz, quanto no escuro, tem efeito positivo sobre a qualidade fisiológica das sementes de tomate, melhorando a germinação sem prejudicar o vigor das sementes (FERREIRA, 2012).

Ferreira (2012) constatou que o tratamento de sementes de tomate com os corantes associados apresentou maior controle da bactéria. No entanto, seu uso pode acarretar em danos na germinação das sementes quando comparado com a testemunha, divergindo dos resultados obtidos neste trabalho, o qual demonstrou que o tratamento testemunha foi semelhante aos corantes associados na concentração de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A formação de espécies reativas de oxigênio pode danificar componentes celulares como proteínas, lipídeos e DNA (DU et al., 2011; PERUSSI, 2007; PINTON et al., 2012; PHOENIX et al., 2003), sendo que espécies reativas de oxigênio exercem papel importante sobre a fisiologia das sementes e estão presentes nas fases de desenvolvimento destas (LEYMARIE et al., 2012).

Estudos sugeriram que qualquer concentração de espécies reativas de oxigênio fora do intervalo estabelecido impede a germinação ou diminuem o vigor das sementes (BAILLY et al., 2008). Também vale ressaltar a possibilidade de os corantes impedirem o fluxo de água pelos poros da proteína aquaporina, uma vez que esta é responsável pelo transporte de água para a semente, auxiliando na germinação (DE GROOT e GRUBMULLER, 2001).

Para o índice de velocidade de emergência (IVE) das sementes de canola, o corante AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) apresentou os menores índices, independente do genótipo, quando comparado com demais corantes, irradiado e escuro (Tabela 3). Na testemunha, apesar de alguns genótipos não diferirem dos corantes, obteve os maiores IVE, exceto

no genótipo Terola 10A40 SS irradiado, com valor de 5,63. De modo geral, resultados semelhantes foram encontrados na porcentagem de germinação do genótipo Terola 10A40 SS.

TABELA 3. Índice de velocidades de emergência (IVE) de diferentes genótipos de canola, tratadas com diferentes corantes, irradiadas ou não, em condições de casa de vegetação. Uberlândia - MG, 2017.

| Corantes | Índice de velocidade de emergência | | | | |
|------------|------------------------------------|-----------|----------|-----------|--------------------|
| | Terola 10A40 SS | | Hyola 61 | | Terola 10A40 MT |
| | Escuro | Irradiado | Escuro | Irradiado | |
| AM 100 | 7,50abA | 7,77aA | 3,95cB | 8,08aA | 8,02ab |
| AM + AT 25 | 8,54abA | 7,95aA | 7,79bA | 7,44aA | 9,93 ^a |
| AT 50 | 5,68bA | 0,82bB | 2,53cA | 3,13bA | 5,99b |
| TEST | 9,64aA | 5,63aB | 11,50aA | 8,27aB | 10,36 ^a |
| CV % | 28,24 | | 24,20 | | 23,96 |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. AM: Azul de Metileno; AT: Azul de Toluidina.

No entanto, Ferreira (2012) observou que não houve diferença significativa entre os corantes e a testemunha para o índice de velocidade de emergência, sendo que as sementes de tomate inoculadas com *Xanthomonas* spp. e irradiadas apresentaram um índice um pouco maior, e que os corantes AM e AT não interferiram na qualidade fisiológica das sementes de tomate.

Para porcentagem de emergência de plântulas (Tabela 4) os genótipos Hyola 61 e Terola 10A40 MT interagiram significativamente ($P>0.05$) para a variável corante, enquanto que, para o genótipo Terola 10A40 SS, a interação foi significativa entre corantes e irradiação.

Para o genótipo Hyola 61 a porcentagem de emergência de plântulas não diferiu significativamente entre a testemunha (84%) e os corantes AM+AT (81) e AM (62%), no entanto, diferiram significativamente do corante AT (36%).

No genótipo Terola 10A40 SS, quando as sementes foram tratadas com o corante AT e irradiadas, a emergência de plântulas foi de 11%, diferindo significativamente das sementes não irradiadas (63%), enquanto que os demais tratamentos obtiveram valores acima de 54%. Em se tratando da condição de escuro, não houve diferença significativa entre os corantes. A interação entre as variáveis, irradiada e escuro, nos tratamentos AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Test apresentaram diferenças, sendo que para ambos os tratamentos, a

irradiação afetou a emergência de plântulas havendo diferenças entre 83% e 31%, respectivamente.

A porcentagem de emergência de plântulas do genótipo Terola 10A40 MT foi de 93% quando as sementes foram tratadas com AM+AT, diferindo significativamente do tratamento AT (64%).

Independente dos genótipos de canola analisados, o corante AT (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) reduziu a emergência de plântulas em condições de casa de vegetação, isso se explica devido à formação de complexos metacromáticos. A interação deste com lipopolissacarídeos o torna um corante mais tóxico quando comparado ao AM (USACHEVA et al., 2008). Em contrapartida, não houve diferença significativa entre os tratamentos AM 100, AM+AT 25 e a testemunha (Tabela 4) para os todos os genótipos, exceto para o genótipo Terola 10A40 SS na testemunha irradiada.

TABELA 4. Porcentagem de emergência de plântulas de diferentes genótipos de canola, tratadas com diferentes corantes, irradiadas ou não, em condições de casa de vegetação. Uberlândia - MG, 2017.

| Porcentagem de emergência de plântulas de canola | | | | |
|--|----------|-------|----------|-------|
| Hyola 61 | | | | |
| Variável | Corantes | | | |
| | AM 100 | AT 50 | AM+AT 25 | TEST |
| %Emergência | 62 a | 36 b | 81 a | 84 a |
| CV% | 24,28 | | | |
| Terola 10A40 SS | | | | |
| Variável | Corantes | | | |
| | AM 100 | AT 50 | AM+AT 25 | TEST |
| Irradiado | 73 aA | 11 bB | 73 aA | 54 aB |
| Escuro | 71 aA | 63 aA | 81 aA | 78 aA |
| CV% | 24,52 | | | |
| Terola 10A40 MT | | | | |
| Variável | Corantes | | | |
| | AM 100 | AT 50 | AM+AT 25 | TEST |
| % Emergência | 78 ab | 64 b | 93 a | 89 ab |
| CV% | 25,15 | | | |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. AM: Azul de Metileno; AT: Azul de Toluidina.

A terapia fotodinâmica foi considerada um tratamento eficiente para o controle de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate, e uma forma alternativa de controle de

fitobactérias em sementes (FERREIRA, 2012). Em sementes de canola possivelmente esta mesma eficiência não foi alcançada, por estas apresentarem um tegumento menos rígido do que as sementes de tomate ou por serem pequenas em relação à concentração utilizada do produto, já que este apresentou toxidez às sementes de canola.

Diante dos resultados atingidos, se faz necessário experimentos adicionais para testar os corantes AM e AT em diferentes concentrações testadas neste trabalho para as sementes de canola. O tratamento das sementes com corantes fotossensíveis pode ser uma alternativa eficaz contra patógenos, uma vez que a utilização de agroquímicos não apresenta a eficiência necessária para bactérias e sua não utilização pode trazer benefícios para o meio ambiente.

4 CONCLUSÕES

Os corantes Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a associação deles, nas concentrações 100, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, quando irradiados foram eficazes para controle de Xcc *in vitro*.

Não foi possível estimar a eficiência dos corantes quanto à detecção de Xcc em sementes de canola devido à baixa taxa de infecção da bactéria nas sementes testadas.

O tratamento de sementes com os corantes afetou a qualidade fisiológica das sementes de canola avaliadas.

REFERÊNCIAS

- BAILLY, C.; BOUTEAU, H. EL-M.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 806-814, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes (RAS)**. Brasília: Mapa/Assessoria de Comunicação Social, 2009.
- DE GROOT, B. L.; GRUBMULLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. **Science**, New York, v. 294, p. 2353 - 2357, 2001.
- DE PAULA, L. F. **Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando LED e sua aplicação à fotoinativação de *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton rubrum***. 2010. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- DENIS, T. G.; DAI, T.; IZIKSON, L.; ASTRAKAS, C.; ANDERSON, R. R.; KAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Landes Bioscience**, Boston, p.509-520, (a), 2011.
- DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. Antifungal Photodynamic Therapy. **Microbiological Research**, Jena, v.163, p. 1-12, 2008
- DU, W.; SUN, Y.; JI, R.; ZHU, J.; WU, J.; GUO, H. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. **Journal of environmental monitoring : JEM**, Cambridge, v. 13, p. 822–828, 2011.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3**. Lavras-MG: UFLA, 2010.
- FERREIRA, S. F. **Tratamento fotodinâmico de sementes de tomate (*Solanum lycopersicon* MILL.), na inativação da bactéria *Xanthomonas* spp.** 2012, 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia. 2012.
- HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.21, p. 243-269, 1983.
- HUSSAIN, S., HARRIS, F., PHOENIX, D. A. The phototoxicity of phenothiazinium-based photosensitizers to bacterial membranes. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 124-130. 2006.
- IBM Corp. **IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0**. Armonk, New York, 2011.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-979, 1970.

LEYMARIE, J.; VITKAUSKAITĖ, G.; HOANG, H. H.; GENDREAU, E.; CHAZOULE, V.; MEIMOUN, P.; CORBINEAU, F.; BOUTEAU, H. EL-M.; BAILLY, C. Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, p. 96-106, 2012.

LONGO, J.P.F.; AZEVEDO, R.B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Clínica e Pesquisa. Odontológica**, Curitiba, v.6, p. 249-257, 2010.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 237-243. 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p.176-77, 1962.

MARCUZZO, L. L.; BECKER, W. F.; FERNANDES, C. F. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de caçador/ SC. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, p. 132-135, 2009.

MARTINEZ, J. L., FAJARDO, A., GARMENDIA, L., HERNANDEZ, A., LINARES, J. F., SOLANO, L. M., SÁNCHEZ, M. B. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 33, p. 44-65, Nov, 2009.

MIGLIORINI, P. **Ocorrência e transmissão de *Alternaria* spp. em sementes de canola**. 2014, 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MILUS, E. A.; MIRLAHI, A. F. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* between successive wheat crops in Arkansas. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, p. 263-265, 1995.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. Desenvolvimento e testagem de um meio seletivo para *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.15, p.209-214, 1993.

NESMITH, W. C. Influence of antagonists e controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, p.1182-1187, 1985.

PELEGRINO, A. C.; CAROLINA, M. M.; GOTARDO, F. A.; SIMIONI, A. R.; ASSIS, M. D.; TEDESCO, A. C. Photophysical properties of crowned porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 81, p. 771-776, 2005.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 988-994, 2007.

PHOENIX, D. A., SAYED, Z., HUSSAIN, S., HARRIS, F., WAINWRIGHT, M. The phototoxicity of phenotiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 17-22, 2003.

PINTON, P. C., ROSSI, M. T., SALA, R., VENTURINI, M. Photodynamic Antifungal Chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 88, p. 512-522, 2012.

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

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

SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: American Phytopathological Society, p. 122, 1989.

SCHAAD, N. W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, p.573-578, 1983

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; LACY, G.H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **APS Press**, Saint Paul, p.175-200, 2001.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, [S.l.], vol. 11, p. 3733-3740, 2016.

SVENSATER, G., WELIN, J., WILKINS, J. C., BEIGHTON, D., HAMILTON, I. R. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, p. 139-146, 2001.

TOMM, G. O. **Canola e girassol: opções de cultivo para o Brasil**. 2015. Disponível em:
<http://www.focorural.com/detalhes/n/n/6394/Canola_e_girassol:_opcoes_de_cultivo_para_o_Brasil.html>. Acesso em: 17 jan. 2018.

TOMM, G. O.; WIETHÖLTER, S.; DALMAGO, G. A.; SANTOS, H. P. dos. **Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Embrapa Trigo, (Documentos Online, 113), Passo Fundo, 2009. Disponível em:
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do113.htm>.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparation of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 29, p. 165-173, 2001.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; USACHEV, Y. M.; SIEVERT, C. E.; BIEL, M. A. Interaction of the photobactericides Methylene Blue and Toluidine Blue with a

fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. **Lasers in Sugery and Medicine**, New York, v. 40, p. 55-61, 2008.

VILLETH, G. R. REIS, F. B.; TONIETTO, A.; HUERGO, L.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction eith the susceptible and the resistant cultivars of Brassica oleracea. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.298, p. 260-266, 2009.

CAPÍTULO 2: Nanopartículas no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *in vitro* e no tratamento de sementes de canola naturalmente contaminadas

RESUMO

O uso de sementes de canola livres de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é a medida mais eficaz para evitar a introdução e disseminação da bactéria no campo. Os produtos químicos não são eficientes e medidas alternativas de controle devem ser avaliadas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de nanopartícula no controle de Xcc *in vitro* e no tratamento de sementes de canola. Os nanocristais de ZnO dopados com prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e níquel (Ni), e os nanocristais puro AgO, CuO, FeO, MnO, NiO e ZnO, em diferentes concentrações e diluições (não diluído, 10^{-1} a 10^{-4}), foram avaliadas na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. Como controle negativo e positivo utilizou-se NaCl 0,45% e Estreptomicina, respectivamente. Os quatro genótipos das sementes de canola foram tratados com ZnO:11Ag, em seguida estas foram submetidas a testes padrão de germinação, índice de velocidade de emergência, porcentagem de emergência de plântulas, teste de sanidade e detecção da bactéria em sementes. Os nanocristais de ZnO, dopados com Ag, Au, Cu, Fe, Mn e Ni, inibiram o crescimento bacteriano *in vitro* em diferentes concentrações, no entanto, o nanocristal de ZnO:11Ag apresentou o maior halo de inibição. Não foi possível estimar o efetivo controle da bactéria nas sementes, devido à baixa taxa de infecção. O tratamento de sementes com o nanocristal afetou a qualidade fisiológica das sementes de canola. Assim, novos ensaios deverão ser conduzidos para avaliar diferentes concentrações dos nanocristais, no controle da bactéria em sementes de canola.

Palavras-chave: *B. napus*, qualidade fisiológica, tratamento de sementes, ZnO:11Ag, nanocristais, nanopartículas.

CHAPTER 2: Application of Nanoparticles for the control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *in vitro* and in the canola seed treatment naturally contaminated

ABSTRACT

The most effective measure to avoid introduction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) and its spreading in the canola field consists in the use of seeds without the presence of bacteria. Chemicals products are not efficient and alternative control measures should be evaluated. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of nanocrystal in the Xcc control *in vitro* and canola seed treatment. ZnO nanocrystal doped with silver (Ag), copper (Cu), gold (Au), manganese (Mn), nickel (Ni), iron (Fe), ZnO, AgO, NiO, MnO, FeO and CuO at different concentrations and dilutions (non-diluted, 10^{-1} to 10^{-4}) were evaluated to identify bacterial growth inhibition *in vitro*. On the other hand, it was used 0.45%NaCl and Streptomycin, as negative and positive control, respectively. Four canola genotypes seeds were treated with ZnO: Ag11% and submitted to germination test, emergency speed rate, seedling emergence percentage, seed health test (Blotter Test) and bacterial detection. The nanocrystal from ZnO doped with Ag, Au, Cu, Fe, Mn and Ni inhibited the bacterial growth *in vitro* using different concentrations, however, the nanocrystal ZnO:11Ag showed the larger bacterial inhibition halo. Therefore, it was not possible to estimate the control effectiveness of the bacteria in the seeds due to low pathogen infection rate. The seed treatment using nanocrystal affected the physiological canola seed quality. Thus, new studies should be done to evaluate different concentrations of nanocrystals in the control of bacteria in canola seeds.

Keywords: *Brassica napus*, physiological quality, seed treatment, ZnO:11Ag, nanocrystals, nanoparticle.

1 INTRODUÇÃO

A canola é a terceira oleaginosa mais produzida no mundo, pertencente à família das Brassicaceae, que produz grãos ricos em óleo de excelente qualidade. A produção de grãos desta cultura se tornou importante devido a sua utilização para produção de óleo vegetal comestível, na produção de biodiesel e rações para animais (TOMM et al., 2007). No entanto, a produtividade dessa cultura pode ser afetada pelo ataque de fitobactérias.

A podridão negra, causada pela bactéria *X. campestris* pv. *campestris*, é considerada uma das principais doenças das brássicas. Essa bactéria pode sobreviver em solos, restos culturais doentes, plantas daninhas, plantas remanescentes no campo, mas, principalmente, em sementes (TEBALDI, 2007; SCHAAD; WHITE, 1974; SCHULTZ; GABRIELSON, 1986; SCHAAD; DIANESE, 1981; KUAN et al., 1986; MARINGONI, 2005). Por isso, torna-se importante o uso de sementes livres do patógeno (MASSOMO et al., 2004; WILLIAMS, 1980; MARINGONI, 2005).

O tratamento de sementes é imprescindível no controle de doenças, no entanto, os produtos disponíveis no mercado para o controle de bactérias são ineficientes. Dessa forma, medidas alternativas de controle de patógenos nas sementes devem ser avaliadas, como o uso de nanopartículas. Nesse sentido, a aplicação da nanotecnologia tem ganhado força nos últimos 15 anos e estima-se que até o final desta década, a nanociência será empregada por mais de 6 milhões de pessoas no mundo, seja em pesquisas científicas, seja em aplicações tecnológicas (KAUR et al., 2014).

A nanotecnologia, em conjunto com a ciência de materiais, alcançou o domínio de partículas e interfaces com dimensões muito pequenas, numa escala nanométrica entre 1 e 100 nanômetros. Como as partículas são extremamente pequenas, os nanocristais apresentam uma grande área superficial e apresentam propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas diferentes de partículas e superfícies macroscópicas (QUINA, 2004).

Sendo assim, as nanopartículas com tamanhos inferiores a 100 nm apresentam elevado eficiência biocida, por permitirem interações com as membranas microbianas e por apresentarem um tamanho pequeno, além de alta relação de superfície/volume (ALLAKER, 2010; MORONES et al., 2005).

Entre os vários óxidos de metais pesquisados o ZnO apresenta características altamente bactericidas, tanto em bactérias Gram-positivas, como nas Gram-negativas,

sendo esse material capaz de combater tanto os patógenos, como seus esporos (SAWAI et al., 1996; KARUNAKARAN et al., 2011; FU et al., 2005). Além disso, esse óxido é biocompatível e não genotóxico.

O efeito bactericida de ZnO pode ser conferido devido a formação de espécies reativas de oxigênio na superfície do óxido de zinco (SAWAI; YOSHIKAWA, 2004), a liberação de íons antimicrobianos, principalmente Zn^{2+} (KASEMETS et al, 2009; LI et al, 2011) ou pelo contato direto de nanopartículas ZnO com a parede celular da bactéria, levando a destruição da integridade da célula bacteriana (BRAYNER et al., 2006; ZHANG et al., 2007; ADAMS et al., 2006)

A prata, cobre, selênio, dióxido de titânio e óxido de zinco são alguns exemplos de nanomateriais com capacidade de matar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos de modo natural (GRUMEZESCU, 2016).

Assim, nanopartículas de ZnO dopado com Ag, Mn, Au, Cu, Ni e Fe em diferentes concentrações, foram eficientes no controle de diversas bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., entre outras (LI et al., 2015, REKHA et al., 2010; HE et al., 2014; BAI et al., 2011; BRINTHA; AJITHA, 2016).

A prata é um metal que apresenta uma grande capacidade antimicrobiana, tanto para bactérias, quanto para fungos, principalmente em condições de nanopartículas (PAL et al., 2007; SAWAI e YOSHIKAWA, 2004; PANACEK et al., 2006). Além disso, ressalta-se que a prata não é tóxica para as células humanas quando utilizada em baixa concentração (ZHANG et al., 2007; PAL et al., 2007).

A nanotecnologia tem se mostrado cada vez mais promissora em diversas áreas, como na têxtil, alimentícia, médica, agrícola, entre outras. No entanto, paralelo a essa tecnologia existe a preocupação com o meio ambiente e os seres humanos, assim alguns pesquisadores tem se questionado quanto aos riscos desta inovação (BELL, 2006). O uso exagerado de produtos químicos tem gerado bactérias resistentes às substâncias utilizadas no mercado. Diante disso, torna-se necessário estudos de formas alternativas e sustentáveis, como o uso de nanopartículas no controle de fitobactérias.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso de nanocristais no controle de Xcc *in vitro* e no tratamento de sementes de canola. Os objetivos específicos foram avaliar o uso de diferentes nanocristais no controle de Xcc *in vitro*, além de avaliar o uso do nanocristal ZnO: 11Ag no tratamento de sementes de canola, para o controle de Xcc.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, no Laboratório de Sementes e em casa de vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - MG, no período de março a junho de 2017.

2.1 Toxidez de nanocristais à Xcc

Para determinação da toxidez dos nanocristais à Xcc, utilizou-se ZnO dopado com seis elementos: prata (Ag), ouro (Au), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e níquel (Ni), em diferentes concentrações e os nanocristais óxidos puros (Tabela 1). Os nanocristais foram sintetizados no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores, do Instituto de Física da UFU. Cada nanocristal foi preparado a $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ de solução de NaCl 0,45% e agitadas para sua homogeneização, posteriormente, foram feitas suas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}).

O isolado UFU F64 de Xcc pertencente à coleção de trabalho foi cultivado em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970). Após 48 horas, a bactéria foi cultivada em meio de cultura Nutriente Líquido, sob agitação a 150 rpm a 28 °C por 24 horas.

A toxidez direta dos nanocristais foi avaliada através 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 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 positivo e negativo foi usado NaCl 0,45% e estreptomicina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente (Figura 1). As placas de Petri foram incubadas em estufa a 28 °C por 48 horas. O diâmetro do halo de inibição foi avaliado em centímetros. Além disso, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições.

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

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

ZnO:Ag: Óxido de Zinco dopado com Prata; ZnO:Au: Óxido de Zinco dopado com Ouro; ZnO:Cu: Óxido de Zinco dopado com Cobre; ZnO:Fe: Óxido de Zinco dopado com Ferro; ZnO:Mn: Óxido de Zinco dopado com Manganês; ZnO:Ni: Óxido de Zinco dopado com Níquel; AgO: óxido de Prata; ZnO: Óxido de zinco; CuO: Óxido de Cobre; FeO: Óxido de Ferro; MnO: Óxido de Manganês; NiO: Óxido de Níquel.

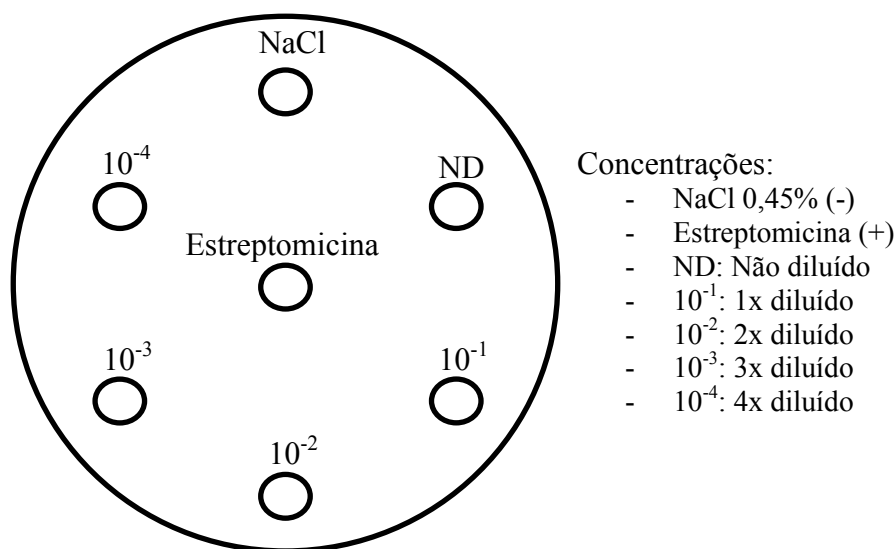


FIGURA 1. Esquema da distribuição dos discos de papel em placa de Petri, contendo meio de cultura. Uberlândia – MG, 2017.

2.2 Tratamento de sementes de canola com o nanocristal ZnO:11Ag

O nanocristal ZnO:11Ag foi escolhido para o tratamento das sementes após a avaliação dos antibiogramas (bioensaio). Todos os nanocristais testados apresentaram controle da bactéria, no entanto, o ZnO:11Ag foi o que apresentou os maiores halos de inibição.

Dessa forma, as sementes dos genótipos de canola Terola 10A40 (Uberaba-MG, 2014), Terola 10A40 (Serra do Salitre-MG, 2014), Hyola61 (Área experimental Rio Grande do Sul, 2014) e Terola 10A40 (Área experimental-MT, 2013) naturalmente contaminadas com Xcc, foram tratadas com o nanocristal ZnO:11Ag a $0,01 \text{ g.mL}^{-1}$ de solução de NaCl 0,45% e com a solução de NaCl 0,45%, como testemunha.

As sementes de cada genótipo foram colocadas em placas de Petri e foi adicionado 20 mL da solução de ZnO: 11Ag, ou NaCl 0,45% (testemunha). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 20 minutos.

2.2.1 Detecção de Xcc em sementes de canola

Para a detecção de Xcc nas sementes de canola foram utilizadas 200 sementes com oito repetições para cada genótipo de sementes, tratadas ou não. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizados, em um arranjo fatorial 4×2 (genótipos x tratamentos).

As sementes de canola foram colocadas sobre o meio de cultura semi-seletivo NSCAA (SCHAAD et al., 2001) em placas de Petri, e incubadas em estufa a 28°C por 72 horas. Após este período, avaliou-se o número de sementes com a presença de Xcc, determinando a porcentagem de sementes contaminadas.

2.2.2 Teste padrão de germinação das sementes de canola

O teste padrão de germinação foi realizado de acordo com a RAS (BRASIL, 2009), utilizando 200 sementes para cada tratamento. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4×2 (genótipos x tratamentos), com quatro repetições de 50 sementes cada.

As sementes foram colocadas sobre duas folhas de papel mata borrão, em “gerbox”. O papel foi embebido com água, equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. As sementes foram levadas ao germinador à temperatura de $20\text{-}30^\circ\text{C} \pm 2$, com fotoperíodo de 8 h luz/16 h escuro (BRASIL, 2009).

As avaliações foram realizadas pela contagem de plântulas normais emergidas, sendo a primeira e a última contagem, no quinto e sétimo dia, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação, conforme critérios estabelecidos pela RAS (BRASIL, 2009).

2.2.3 Índice de velocidade de emergência e emergência de plântulas

O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando-se 200 sementes, com quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram semeadas em bandejas descartáveis de isopor (25 cm x 20 cm) contendo areia. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, em um arranjo fatorial 4 x 2 (genótipos x tratamentos).

A contagem de plântulas (cotilédones visíveis) ocorreu diariamente, a partir do segundo dia até o nono dia após a semeadura. Ao final das avaliações com o número de plântulas emergidas, calculou-se o índice de velocidade de emergência (IVE) pela fórmula (MAGUIRE, 1962):

$$IVE = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$$

Onde:

G: número de plântulas normais emergidas, a cada avaliação;

N: número de dias após a semeadura.

A emergência de plântulas foi avaliada pelo número de sementes emergidas no nono dia após a semeadura, calculando-se a porcentagem de plântulas emergidas.

2.2.4 Teste de sanidade de sementes de canola

A qualidade sanitária das sementes de canola foi avaliada pelo “blotter test”. Para tanto, utilizou-se 200 sementes de cada tratamento, sendo estas distribuídas em quatro “gerbox” com 50 sementes cada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4 x 2 (genótipos x tratamentos).

As sementes foram colocadas sobre 2 folhas de papel mata borrão, em “gerbox”. O papel foi embebido com água, equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, posteriormente os “gerbox” foram levados para BOD à temperatura de 20 °C ±1 (BRASIL, 2009). Após sete dias de incubação foram detectados e identificados os fungos presentes nas sementes, com auxílio do microscópio estereoscópio. Em seguida, calculou-se a porcentagem de incidência dos fungos nas sementes.

2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de pressuposições, teste de normalidade (Shapiro Wilk), homogeneidade (Levene) e aditividade, sendo o último utilizado apenas para experimento em delineamento em blocos casualizados, pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM CORP, 2011).

Quando necessário, os dados foram transformados em $\log x+1$ ou $\sqrt{x+1}$ para atender as pressuposições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Dunnet a 5% de probabilidade, as análises foram realizadas através do programa estatístico SISVAR versão 5.30 (FERREIRA, 2010) e Assistat versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Toxidez de nanocristais à *Xcc*

3.1.1 Nanocristais de prata (*Ag*)

De acordo com a análise de dados, houve interação significativa ($P < 0.05$) entre os fatores (concentração e diluição) pelo teste de Tukey (Tabela 2). O ZnO:Ag nas concentrações 1, 3, 7, 9 e 11%, da solução não diluída (ND) e as concentrações 3, 7 e 9% da solução diluída uma vez (10^{-1}) apresentaram halos de inibição variando de 2,10 a 2,50 cm de diâmetro, diferindo dos demais. O NaCl e a Estreptomicina usados como controle negativo e positivo, não inibiram e inibiram o crescimento de *Xcc in vitro*, respectivamente.

Pelo teste de Dunnet (5%), na comparação do nanocristal AgO (1,30) (Tabela 2, Figura 2) com ZnO:Ag não diluído, observa-se que houve diferença significativa para as concentrações de Ag a 7, 9 e 11%, com halo de inibição variando de 2,1 a 2,35 cm de diâmetro. Ainda na comparação com diluição 10 vezes, houve diferença significativa para as concentrações 0,3; 3; 7 e 9%. Para a diluição 10^{-2} , houve diferença significativa para as concentrações 0,3; 0,7; 1; 7; 9 e 11%, e nas diluições 10^{-3} e 10^{-4} , houve diferença significativa para todas as concentrações de ZnO:Ag.

Quando comparado o nanocristal puro ZnO com o ZnO:Ag não diluído (ND) (Tabela 2, Figura 2), observa-se que houve diferença significativa para as concentrações de 0,7; 1; 3; 7; 9 e 11%. Enquanto, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , resultados semelhantes foram observados, ou seja, nas concentrações 1, 3, 7, 9, 11% e 3, 7%, respectivamente. Portanto, a combinação de ZnO dopado com as maiores concentrações de Ag apresentam maior halo de inibição do crescimento de *Xcc*, do que AgO e ZnO usados separadamente.

O ZnO:Ag com concentração acima de 0,7% ocorre a formação de AgO, ou seja, além dos nanocristais de ZnO contendo os íons de prata na estrutura, tem o nanocristal AgO. Assim, esse nanocompósito (ZnO:Ag + AgO) apresentam um potencial antimicrobiano maior que o nanocristal de ZnO contendo Ag.

TABELA 2. Halo de inibição de crescimento (cm) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, por nanocristais de ZnO:Ag em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

| Halo de inibição de crescimento de Xcc (cm) | | | | | |
|---|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Concentração ZnO:Ag | Diluição (ZnO:Ag) | | | | |
| | ND | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
| 0,3 | 0,75 cA | 0,35 eAB+ | 0,00 bB+ | 0,00 aB+ | 0,00 aB+ |
| 0,7 | 1,40 bcA* | 0,80 deA | 0,00 bB+ | 0,00 aB+ | 0,00 aB+ |
| 1 | 1,90 abA* | 1,25 cdA* | 0,00 bB+ | 0,00 aB+ | 0,00 aB+ |
| 3 | 1,75 abB* | 2,50 aA*+ | 1,15 aB* | 0,00 aC+ | 0,00 aC+ |
| 7 | 2,10 abAB*+ | 2,35 abA*+ | 1,60 aB* | 0,00 aC+ | 0,00 aC+ |
| 9 | 2,35 aA*+ | 2,25 abA*+ | 0,00 bB+ | 0,00 aB+ | 0,00 aB+ |
| 11 | 2,25 aA*+ | 1,70 bcA* | 0,00 bB+ | 0,00 aB+ | 0,00 aB+ |
| AgO (testemunha) | 1,30 | | | | |
| ZnO (testemunha) | 0,20 | | | | |
| CV (%) | 33,47 | | | | |

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

ZnO* e AgO+: Médias comparadas as testemunhas, são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância. ND – Não diluído.

No trabalho realizado por Li et al. (2015) constatou-se resultados semelhantes a este, mostrando que ZnO dopado com diferentes concentrações de Ag foi superior ao ZnO puro, controlando de forma significativa a bactéria *Escherichia coli*, sendo que doses acima de 100 µg mL⁻¹ apresentaram maior inibição da bactéria. Esta inibição pode ter ocorrido pela formação de espécies reativas de oxigênio (KARUNAKARAN et al., 2010; MOTSHEKGAA et al., 2013).

O nanocristal puro AgO foi promissor quando comparado ao ZnO, apresentando maior halo de inibição da bactéria *in vitro*. Ratte (1999) salienta que o AgO é bastante solúvel, sendo capaz de liberar íons de prata livres, influenciando diretamente no comportamento das bactérias. Além do mais, estudos recentes demonstraram o efeito bactericida de diferentes materiais à base de prata (SHEN et al., 2011).

Vale salientar, que um dos fatores primordiais no controle de patógenos é o tamanho do nanocristal, ou seja, quanto menor, maior a superfície de contato com o patógeno e, consequentemente, maior a sua eficiência (YAMAMOTO, 2001). Os nanocristais estudados nesse trabalho apresentam aproximadamente os mesmos tamanhos, assim o efeito bactericida observado está relacionado ao íon dopante e sua concentração.

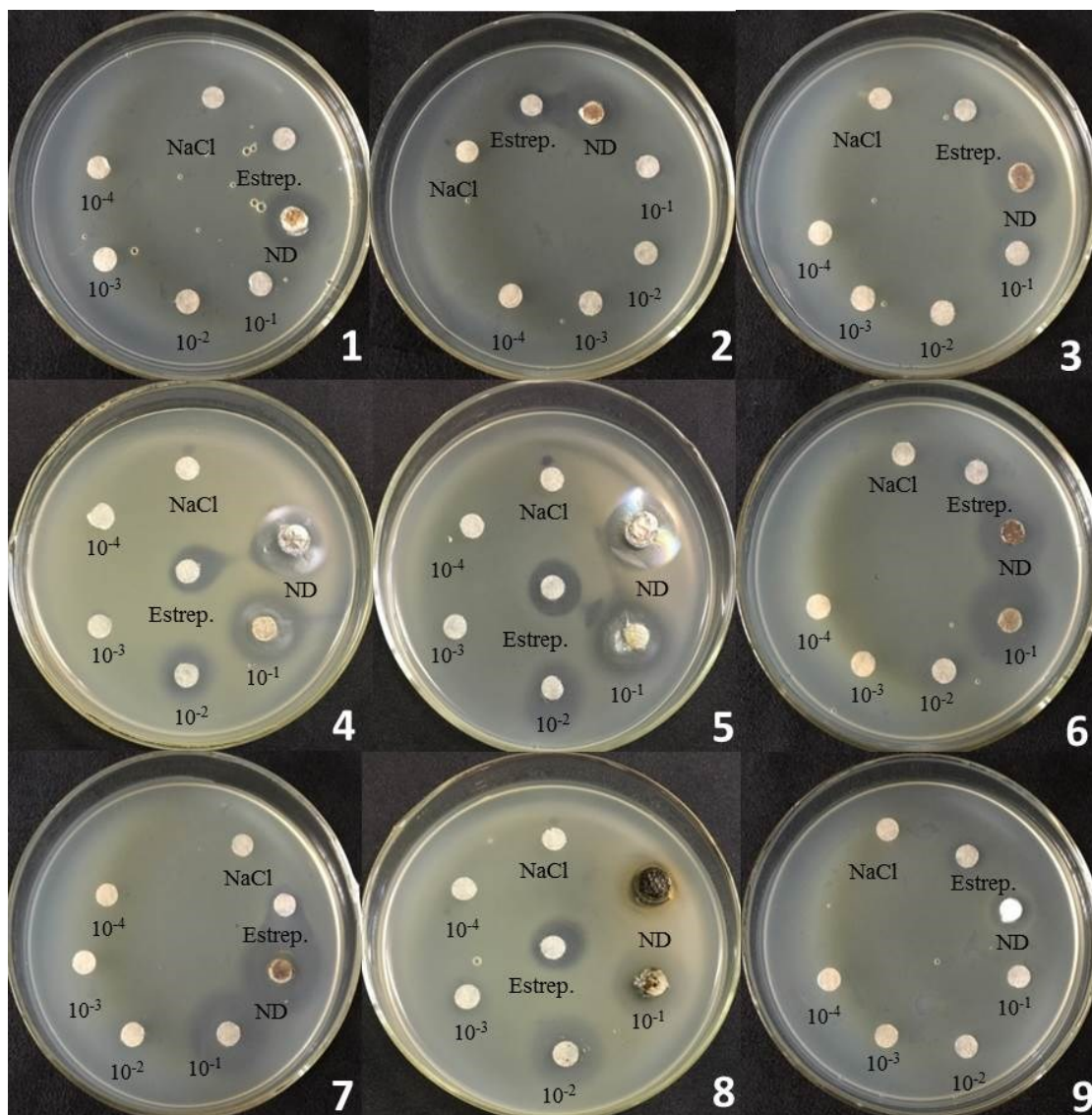


FIGURA 2. Halo de inibição de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com nanocristais de ZnO:Ag em diferentes concentrações de Ag: 1: 0,3%; 2: 0,7%; 3: 1%; 4: 3%; 5: 7%; 6: 9%; 7: 11%; 8: AgO e 9: ZnO. Fonte: BAUTE, 2017.

3.1.2 Nanocristais de manganês (Mn)

Houve interação significativa entre os fatores, de acordo com o teste de Tukey 5% (Tabela 3, Figura 3), do nanocrystal de ZnO:Mn nas devidas concentrações e diluições. Considerando o antibiograma, utilizando esse nanocrystal nas diferentes concentrações de Mn, inibiram o crescimento de Xcc na amostra não diluído, não diferindo significativamente entre si, formando halos de até 1,15 cm de diâmetro. Na diluição 10^{-1} , as concentrações 0,8; 2; 4 e 12%, foram estatisticamente superiores que as demais. Os mesmos tratamentos citados anteriormente, com exceção da diluição 10^{-1}

(concentração 2 e 8%), diferiram estatisticamente tanto do ZnO, quanto do MnO, deixando assim evidente que o ZnO, quando dopado com Mn, apresenta maior controle de Xcc, quando comparado com o ZnO e MnO individualmente.

TABELA 3. Halo de inibição de crescimento (cm) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, por nanocristais de ZnO:Mn em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

| Halo de inibição de crescimento de Xcc (cm) | | | | | |
|---|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Concentração ZnO:Mn | Diluição (ZnO:Mn) | | | | |
| | ND | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
| 0,2 | 1,15 aA*+ | 0,00 Cb | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 0,4 | 1,15 aA*+ | 0,00 cB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 0,8 | 1,10 aA*+ | 0,95 aA*+ | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 2 | 1,00 aA*+ | 0,50 abcAB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 4 | 1,15 aA*+ | 0,80 abA*+ | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 8 | 1,00 aA*+ | 0,40 bcB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 12 | 1,10 aA*+ | 0,85 abA*+ | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| MnO | 0,00 | | | | |
| ZnO | 0,20 | | | | |
| CV (%) | 57,35 | | | | |

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

*ZnO e +MnO: Médias comparadas a testemunha, são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância. ND – Não diluído.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rekha et al. (2010). Esses estudiosos observaram que nanopartículas de ZnO dopadas com Mn nas concentrações de 5% e 10% apresentaram maior atividade antibacteriana para *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, quando comparada a nanocristais de ZnO puros. O uso de nanopartículas de ZnO controlou até 100% da bactéria *Escherichia coli* (ZHANG et al. 2008).

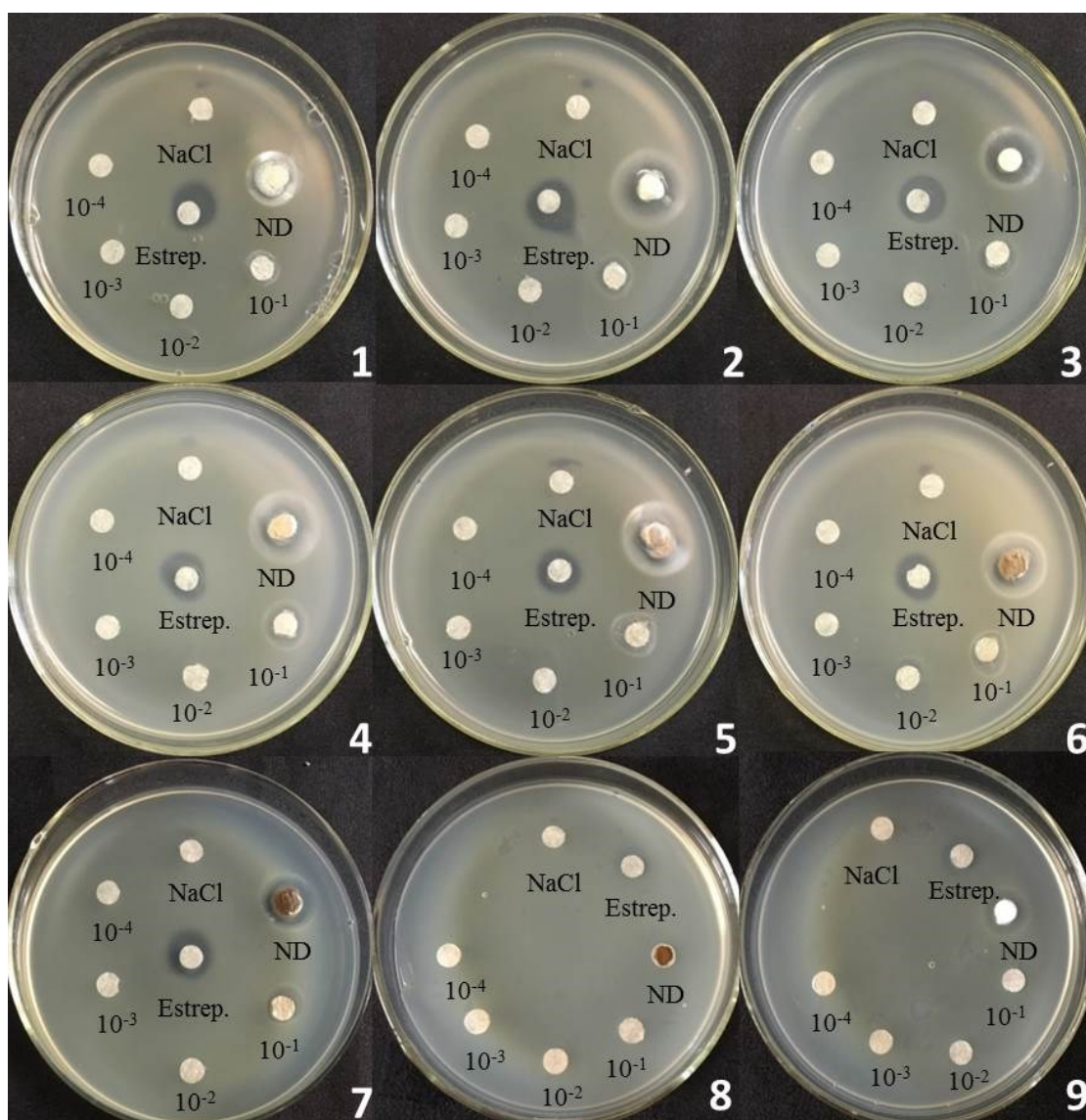


FIGURA 3. Halo de inibição de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com nanocristais de ZnO:Mn em diferentes concentrações de Mn. 1: Mn 0,2%; 2: Mn 0,4%; 3: Mn 0,8%; 4: Mn 2%; 5: Mn 4%; 6: Mn 8%; 7: Mn 12%; 8: MnO e 9: ZnO. Fonte: BAUTE, 2017.

3.1.3 Nanocristais de ouro (Au)

Os nanocristais de ZnO:Au avaliados nas diferentes concentrações e diluições não apresentaram interação significativa ($P > 0.05$) entre os fatores pelo teste de Tukey (Tabela 4, Figura 4). No entanto, a variável diluição apresentou correlação significativa ($P < 0.05$), havendo diferença entre as diluições testadas nas respectivas concentrações. Dessa forma, a amostra ND apresentou um halo de inibição do crescimento de Xcc médio de 1,12 cm de diâmetro, estatisticamente superior às demais diluições, seguido pela diluição de 10^{-1} . Por fim, na comparação do nanocristal de ZnO isoladamente com

os demais tratamentos, nota-se, que todas as concentrações em todas as diluições foram estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunnet a 0,05 de significância.

TABELA 4. Halo de inibição de crescimento (cm) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, por nanocristais de ZnO: Au em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

| Halo de inibição de crescimento de Xcc (cm) | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| Concentração de ZnO: Au | Diluição (ZnO: Au) | | | | | Média |
| | ND | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | |
| 0,1 | 1,15* | 0,95* | 0,00* | 0,00* | 0,00* | 0,42 |
| 0,5 | 1,05* | 0,90* | 0,00* | 0,00* | 0,00* | 0,39 |
| 1 | 1,15* | 1,05* | 0,00* | 0,00* | 0,00* | 0,44 |
| 3 | 1,00* | 0,90* | 0,00* | 0,00* | 0,00* | 0,38 |
| 5 | 1,05* | 0,95* | 0,00* | 0,00* | 0,00* | 0,40 |
| 10 | 1,30* | 0,90* | 0,00* | 0,00* | 0,00* | 0,44 |
| Média | 1,12 ^a | 0,94 ^b | 0,00 ^c | 0,00 ^c | 0,00 ^c | |
| ZnO | 0,20 | | | | | |
| CV (%) | 15,04 | | | | | |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey.

*ZnO: médias comparadas a testemunha são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância.

ND: não diluído.

He et al. (2014) verificaram que as nanopartículas de ZnO dopadas com Au 4% podem aumentar significativamente a atividade antibacteriana em *E. coli* e *S. aureus*, quando comparada com o ZnO puro, sendo considerado um grande potencial para controle de bactérias, principalmente quando irradiadas.

A geração de espécies reativas de oxigênio é considerada a principal causa da morte celular para maioria dos antibióticos e nanomateriais antibacterianos (CUI et al., 2012). No entanto, o controle de bactérias com nanopartículas de Au não é causado pela formação de espécies reativas de oxigênio. Estudos realizados por Cui et al. (2012) verificaram que a atividade antibacteriana das nanopartículas de Au ocorre devido a fixação das nanopartículas à membrana da bactéria, alterando seu potencial e levando a diminuição de síntese de ATP através da inibição da ligação do RNAt ao ribossomo.

Lima et al., (2013) relataram o controle das bactérias *E. coli* e *Salmonella typhi* usando nanopartículas de Au (5nm), apresentando redução de colônias de 90 a 95%, provavelmente devido a rugosidade da nanopartícula e a dispersão da mesma no meio.

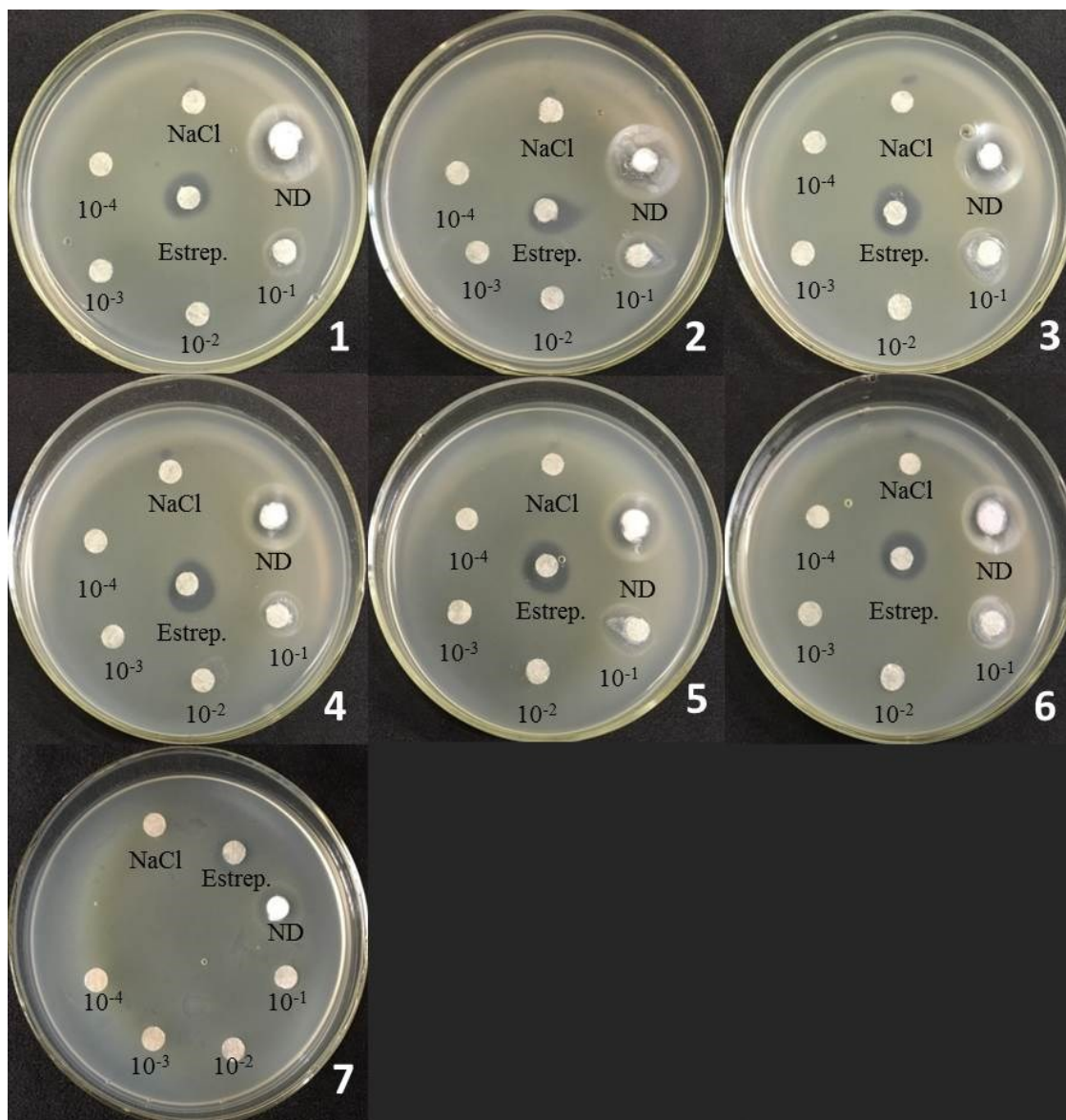


FIGURA 4. Halo de inibição de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com nanocristais de ZnO:Au em diferentes concentrações Au, 1: Au 0,1%; 2: Au 0,5%; 3: Au 1%; 4: Au 3%; 5: Au 5%; 6: Au 10% e 7: ZnO. Fonte: BAUTE, 2017.

3.1.4 Nanocristais de cobre (Cu)

Em relação ao nanocristal de ZnO dopada com Cu (ZnO:Cu), não houve interação significativa ($P > 0.05$) entre os fatores diluição e concentração. Porém, a variável diluição e concentração analisadas isoladamente foram significativas ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey (Tabela 5, Figura 5). Quanto às diluições das amostras, o tratamento ND apresentou na média maior halo de inibição do crescimento da bactéria Xcc (0,8 cm de diâmetro), diferindo estatisticamente das demais diluições, seguido pela diluição 10^{-1} , com 0,68 cm de diâmetro. Todas as concentrações testadas de ZnO:Cu foram

similares estatisticamente, exceto a concentração 12%. Os produtos isolados ZnO e CuO obtiveram a mesma média em relação a formação do halo de inibição da bactéria Xcc, ou seja, 0,2 cm de diâmetro. Por fim, quando comparados com os demais tratamentos (concentração e diluição) notou-se que as concentrações de ZnO:Cu no tratamento ND (todas as concentrações) e 10^{-1} (concentrações 0,1; 1; 4 e 8%), diferiram estatisticamente do ZnO e CuO.

TABELA 5. Halo de inibição de crescimento (cm) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, por nanocristais de ZnO:Cu em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

| Halo de inibição de crescimento de Xcc (cm) | | | | | | |
|---|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Concentração ZnO:Cu | Diluição (ZnO:Cu) | | | | | Média |
| | ND | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | |
| 0,1 | 1,05*+ | 1,00*+ | 0,45 | 0,00 | 0,00 | 0,50a |
| 0,4 | 0,95*+ | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,29ab |
| 1 | 1,05*+ | 0,85*+ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,38ab |
| 4 | 0,85*+ | 0,80*+ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33ab |
| 8 | 1,00*+ | 0,95*+ | 0,30 | 0,00 | 0,00 | 0,45ab |
| 12 | 1,10*+ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,22b |
| Média | 0,80A | 0,68B | 0,13C | 0,00C | 0,00C | |
| CuO | 0,20 | | | | | |
| ZnO | 0,20 | | | | | |
| CV (%) | 54,51 | | | | | |

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

*ZnO e +CuO: Médias comparadas a testemunha são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância. ND – Não diluída.

As nanopartículas de cobre, além da sua qualidade para controle de bactérias, apresentam uma vantagem quanto ao baixo custo para seu preparo (WU et al., 2002, AHAMED et al., 2014). Porém, o manuseio dessas nanopartículas deve ser cuidadoso, visto que elas oxidam quando expostas ao ar (USMAN et al., 2013, MAHAPATRA et al., 2008). Diante disso, fica clara a necessidade de maiores cuidados com nanopartículas de Cu, para assim não subestimar sua eficiência. Vale ressaltar, que neste trabalho os íons de cobre ou estão dentro do nanocristal de ZnO ou ligados com oxigênio formando CuO, por isso, não ocorre a oxidação das amostras.

Nanopartículas de ZnO dopadas com Cu apresentam boa inativação de *E. coli* através da utilização de luz, quando comparada ao ZnO puro (BAI et al., 2011).

Apesar dos nanocristais puros ZnO e CuO apresentarem a mesma média no tamanho do halo de inibição, o trabalho realizado por Azam et al. (2012) observou que o ZnO foi mais eficiente que o CuO no controle de bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*).

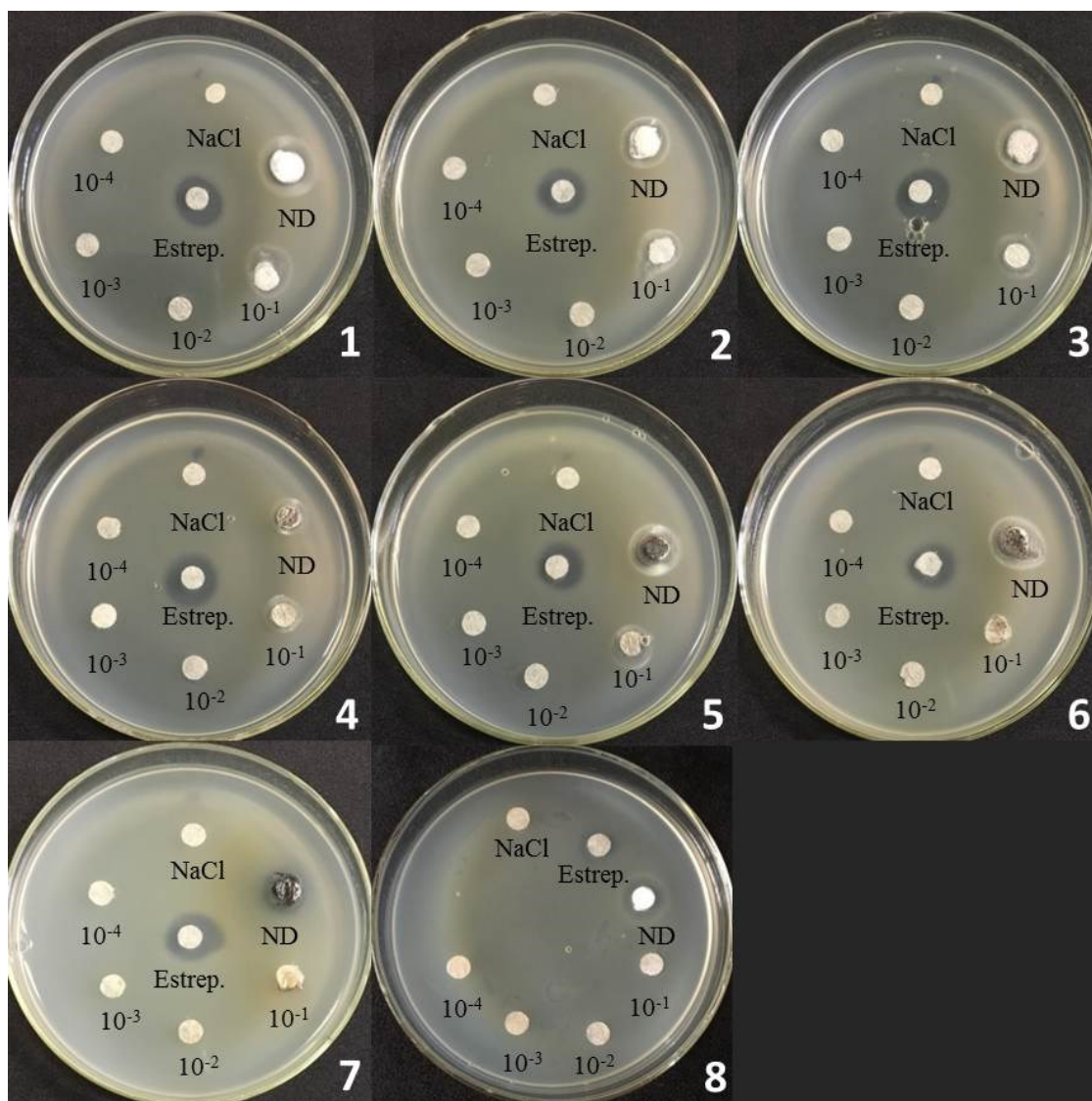


FIGURA 5. Halo de inibição de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com nanocristais de ZnO:Cu em diferentes concentrações de Cu, 1: Cu 0,1%; 2: Cu 0,4%; 3: Cu 1%; 4: Cu 4%; 5: Cu 8%; 6: Cu 12%; 7: CuO e 8: ZnO. Fonte: BAUTE, 2017.

3.1.5 Nanocristais de níquel (Ni)

Na análise dos dados, no nanocristal ZnO dopado com Ni (Tabela 6, Figura 6), observa-se que houve interação significativa entre os fatores pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As concentrações 1 e 11% de ZnO:Ni, na solução não diluída, foram superiores estatisticamente as demais. As concentrações 0,3; 0,7; 1; 3 e 11% da solução não diluída (ND) e a concentração 1% da solução uma vez diluída (10^{-1}) foram diferentes estatisticamente dos nanocristais puros NiO e ZnO pelo teste de Dunnett (5%).

TABELA 6. Halo de inibição de crescimento (cm) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, por nanocristais de ZnO:Ni em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

| Halo de inibição de crescimento de Xcc (cm) | | | | | |
|---|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Concentração ZnO: Ni | Diluição (ZnO:Ni) | | | | |
| | ND | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
| 0,3 | 1,00 bA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 0,7 | 0,80 bcA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 1 | 1,40 aA*+ | 0,80 aB*+ | 0,00 aC | 0,00 aC | 0,00 aC |
| 3 | 0,80 bcA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 7 | 0,45 cA | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 11 | 1,15 abA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| NiO | 0,20 | | | | |
| ZnO | 0,20 | | | | |
| CV (%) | 55,80 | | | | |

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

*ZnO e +NiO: médias comparadas a testemunha são significativas pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância. ND – Não diluída.

A nanopartícula de ZnO pura foi menos eficaz do que nanopartícula de ZnO dopado com Ni ou Co, no controle de *E. coli*. O uso de ZnO: Ni ou Co levou a morte de todas as colônias da bactéria *in vitro* (CHEN et al., 2012), semelhante a este trabalho.

Nanopartículas de ZnO dopadas com Ni foram mais eficientes, quando comparadas com ZnO puro no controle das bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, o ZnO: Ni apresentou maior controle para *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* (BRINTHA e AJITHA, 2016).

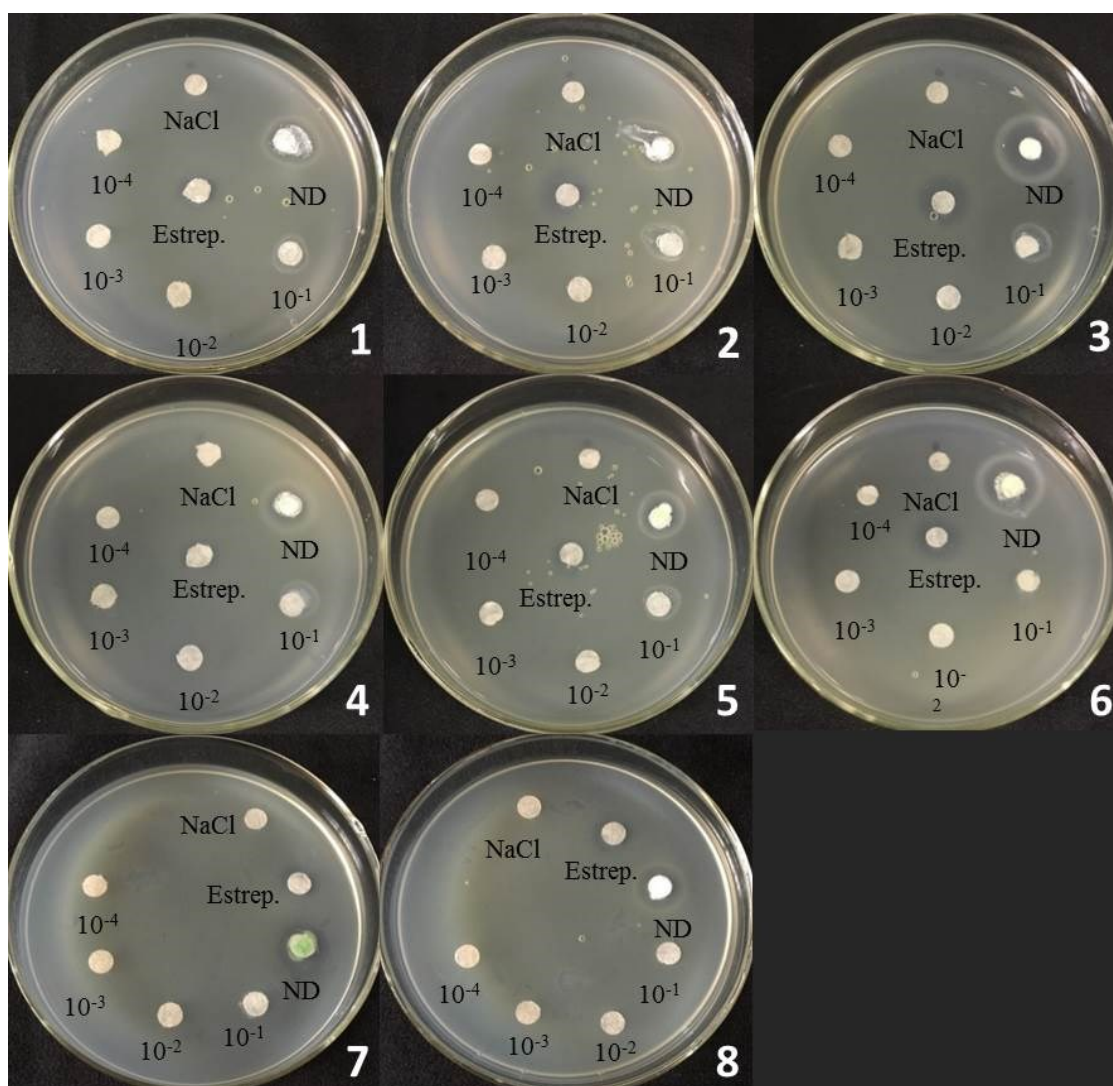


FIGURA 6. Halo de inibição de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com nanocristais de ZnO:Ni em diferentes concentrações Ni. 1: Ni 0,3%; 2: Ni 0,7%; 3: Ni 1%; 4: Ni 3%; 5: Ni 7%; 6: Ni 11%; 7: NiO e 8: ZnO. Fonte: BAUTE, 2017.

3.1.6 Nanocristais de ferro (Fe)

Analisando os dados de nanocristais de ZnO dopado com Ferro (Tabela 7, Figura 7), observou-se que houve interação significativa entre os fatores em estudo pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). O ZnO:Fe nas concentrações 0,05; 0,1; 0,5; 1; 3 e 11% da solução não diluída e nas concentrações 0,05; 0,1 e 0,5% da solução 10^{-1} , foram estatisticamente superiores, com halo de inibição de 0,40 a 1,25 cm de diâmetro.

Os nanocristais FeO e ZnO foram comparados com os demais tratamentos e analisados pelo teste de Dunnet (5%). O ZnO:Fe na solução ND (concentrações 0,05; 0,1; 0,5; 1; 3 e 11%) e na diluição 10^{-1} (concentração 0,5%), diferiram estatisticamente

do ZnO, enquanto que, o FeO diferiu estatisticamente dos tratamentos citados acima e também na concentração 0,1% de ZnO:Fe (diluição 10^{-1}). Dessa maneira, a associação do Fe ao ZnO melhora o efeito do produto para o controle da bactéria Xcc, do que quando os nanocristais ZnO e FeO usados separadamente.

TABELA 7. Halo de inibição de crescimento (cm) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, por nanocristais de ZnO:Fe em diferentes concentrações e diluições, em meio de cultura. Uberlândia –MG, 2017.

| Halo de inibição de crescimento de Xcc (cm) | | | | | |
|---|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Concentração ZnO:Fe | Diluição (ZnO:Fe) | | | | |
| | ND | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
| 0,05 | 0,90 abcA*+ | 0,40 abAB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 0,1 | 1,00 abcA*+ | 0,80 aA+ | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 0,5 | 1,20 aA*+ | 1,00 aA*+ | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 1 | 0,95 abcA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 3 | 1,25 aA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| 7 | 0,50 bcA | 0,00 bA | 0,00 aA | 0,00 aA | 0,00 aA |
| 9 | 0,45 cA | 0,00 bA | 0,00 aA | 0,00 aA | 0,00 aA |
| 11 | 1,10 abA*+ | 0,00 bB | 0,00 aB | 0,00 aB | 0,00 aB |
| FeO | 0,00 | | | | |
| ZnO | 0,20 | | | | |
| CV (%) | 86,03 | | | | |

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

*ZnO e +FeO: médias comparadas a testemunha são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância. ND – Não diluída.

Em trabalho realizado por Ravichandran et al. (2014) foi observado o controle de *E. coli* e *P. aeruginosa* na presença de nanopartículas de ZnO: Fe 8%, sendo que em concentrações acima de 8% houve uma diminuição no controle das bactérias.

De acordo com Azam et al. (2012), o uso de ZnO controlou as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), enquanto que Fe_2O_3 apresentou menor capacidade de controle das bactérias. Resultados semelhantes também foram observados para o controle de *E. coli*, onde atividade antibacteriana do nanocristal puro ZnO foi mais eficiente do que quando dopado com Fe_3O_4 . Enquanto que, para *S. aureus* a nanopartícula ZnO: Fe_3O_4 apresentou maior eficiência de controle quando comparado ao nanocristal ZnO. Esse ocorrido pode ser explicado devido as membranas celulares das bactérias apresentarem composição diferente (SINGH et al., 2015).

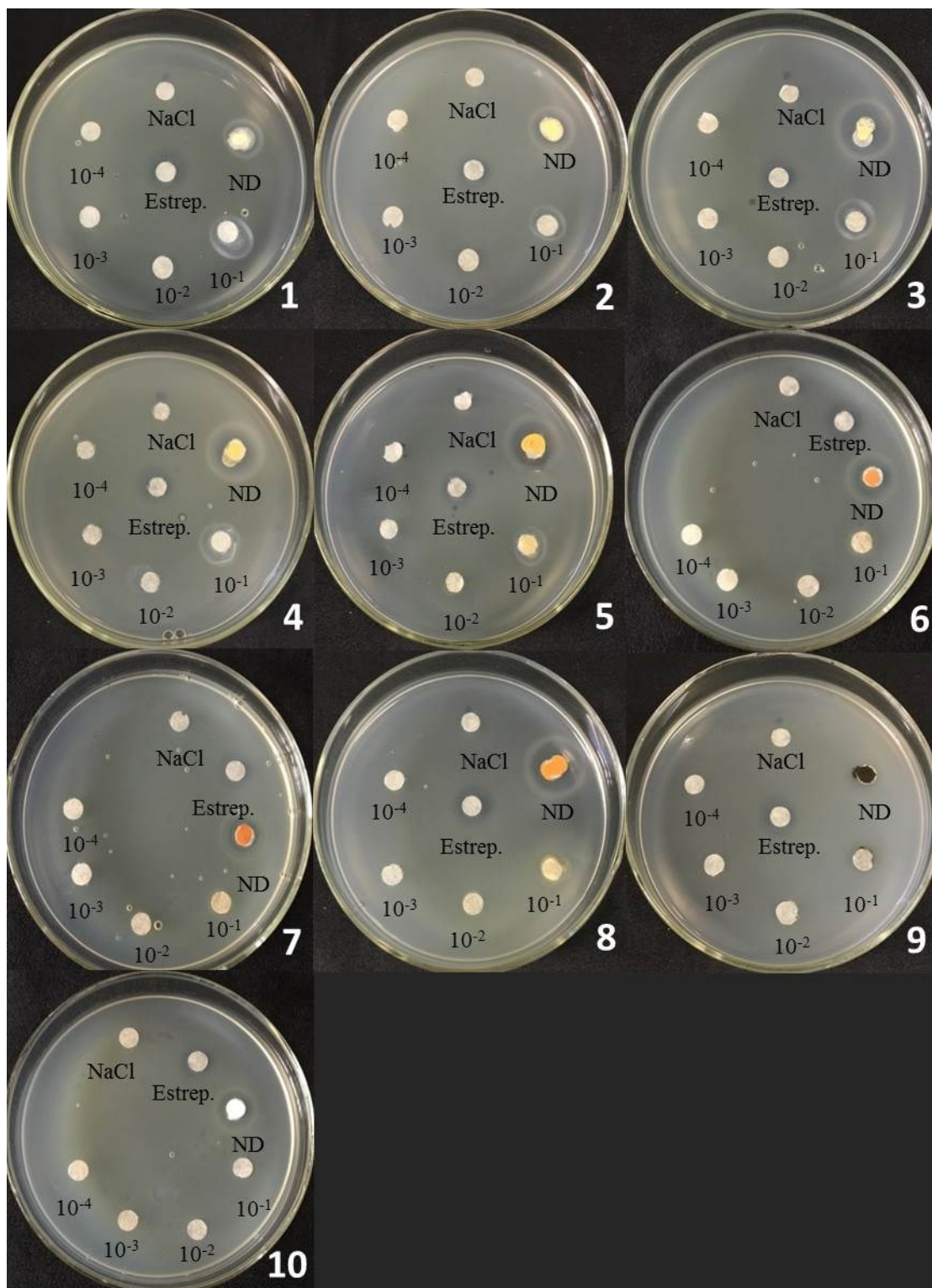


FIGURA 7. Halo de inibição de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com nanocristais de ZnO:Fe em diferentes concentrações Fe. 1: Fe 0,05%; 2: Fe 0,1%; 3: Fe 0,5%; 4: Fe 1%; 5: Fe 3%; 6: Fe 7%; 7: Fe 9%; 8: Fe 11%; 9: FeO e 10: ZnO. Fonte: BAUTE, 2017.

3.2 Uso de nanocristais no tratamento de sementes de canola

Com base nos resultados do ensaio anterior (antibiogramas), o ZnO:11Ag foi o nanocristal que apresentou os maiores halos de inibição. Sendo assim, o mesmo foi selecionado para o tratamento das sementes de canola.

3.2.1 Detecção de *Xcc* e sanidade de sementes de canola

Nas sementes dos diferentes genótipos de canola, Terola 10A40 UB, Terola 10A40 SS, Hyola 61 e Terola 10A40 MT, não tratadas e tratadas com ZnO:11Ag, não foi detectada a presença de *Xcc*. A não detecção da bactéria nas sementes pode ser devido a baixa da taxa de infecção das sementes.

A incidência de outros patógenos em sementes de canola, podem reduzir a qualidade fisiológica das sementes, além da disseminação a longas distâncias, levando a contaminação de áreas ainda consideradas isentas.

Nas sementes de canola foram identificados os fungos *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Phoma* sp. Nos genótipos de canola Terola 10A40 UB e Terola 10A40 SS houve incidência de 7% de *Alternaria* sp. e *Aspergillus* sp., respectivamente, nas sementes não tratadas. O tratamento de sementes de canola com ZnO:11Ag não foi eficiente para a redução dos patógenos nas mesmas (Figura 8).

Fungos do gênero *Alternaria* sp. e *Phoma* sp. são causadores de grandes prejuízos para a cultura da canola. Sementes infectadas com *Alternaria* sp. podem ser completamente destruídas, ocasionando em queda na germinação e transmissão para as plântulas, causando necrose nos cotilédones e hipocótilos e evoluindo a tombamento e morte (MIGLIORINI, 2014). Práticas de manejo em sementes e restos culturais são imprescindíveis para o controle da doença canela preta (*Leptosphaeria maculans/Phoma lingam*), que é considerada uma importante doença na cultura (TOMM et al., 2009).

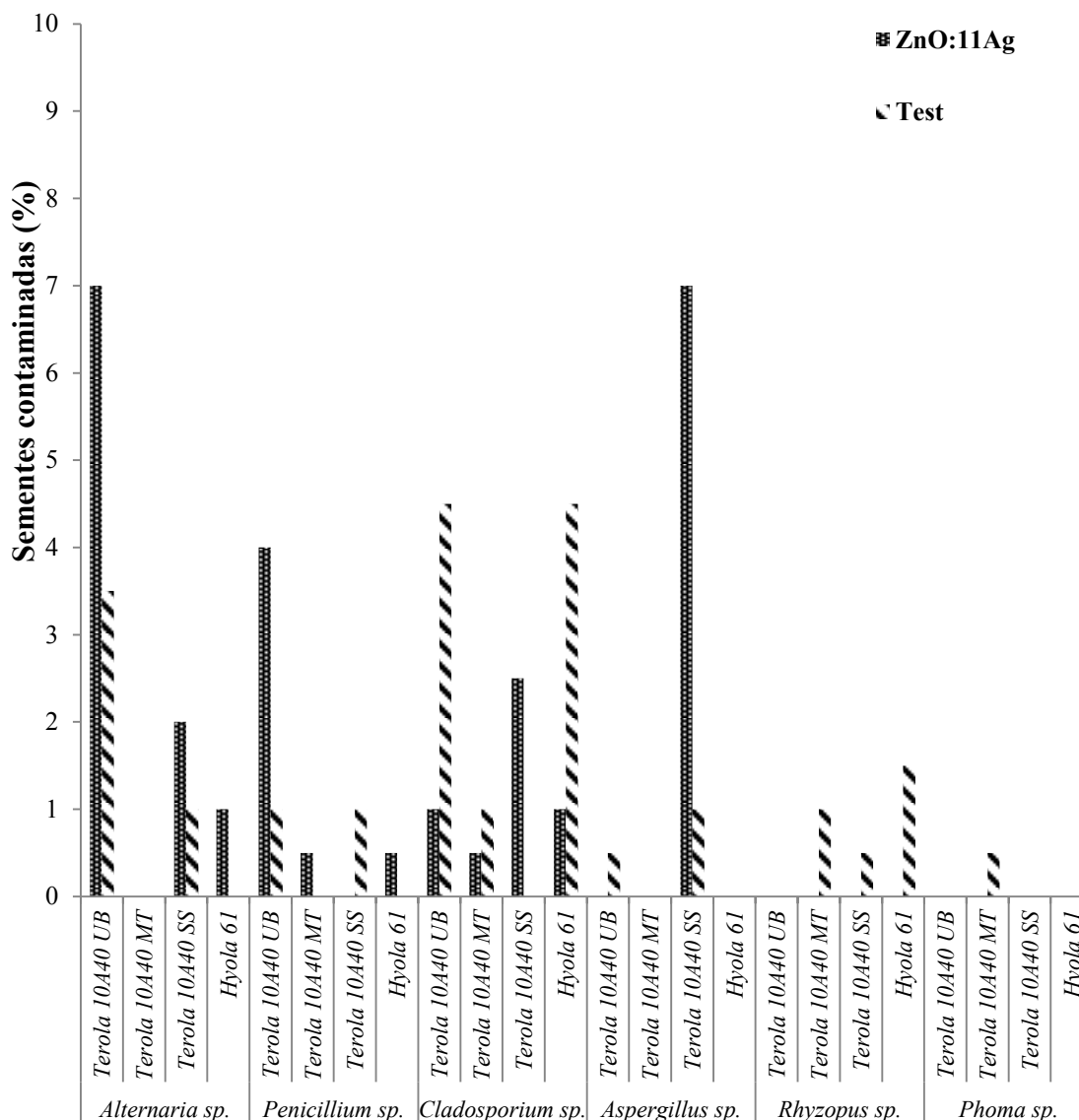


FIGURA 8. Incidência de fungos nas sementes de diferentes genótipos de canola, não tratadas e tratadas com ZnO:11Ag. Uberlândia, MG, 2017.

Estudos com as nanopartículas de prata FDAg-12/90 e FDAg-12/90-100, não apresentaram redução no crescimento micelial de *Fusarium pallidoroseum*. Em contrapartida, no mesmo estudo, outra nanopartícula de prata FDAgBH-100, a maior dose apresentou controle no crescimento micelial dos fungos *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*, sendo maior eficiência observada para os fungos *Fusarium pallidoroseum* e *Colletotrichum musae* (ARAUJO, 2014).

Segundo Rai (2003), nanopartículas de prata apresentaram controle no crescimento de fungos do gênero *Candida*. O mesmo foi confirmado por Segala et al.

(2012) e Carreira et al. (2009), os quais verificaram que nanopartículas de prata controlaram em 100% o crescimento de *Candida albicans*.

3.2.2 Germinação de sementes e índice de velocidade de emergência de plântulas de canola

A porcentagem de germinação das sementes não tratadas foi de 53, 74, 64 e 73%, para as cultivares de canola Terola 10A40 UB, Terola 10A40 MT, Terola 10A40 SS e Hyola 61, respectivamente (Tabela 8). As sementes da cultivar Terola 10A40 UB não tratada apresentaram a menor porcentagem de germinação (53%), diferindo significativamente das demais cultivares. As sementes de canola dos diferentes genótipos, quando tratadas com ZnO:11Ag, diferiram significativamente entre si, apresentando porcentagem de germinação variando de 45 a 75%.

O tratamento das sementes com nanocristais de ZnO:11Ag reduziu a porcentagem de germinação das sementes de canola, diferindo significativamente das sementes não tratadas, exceto para o genótipo Terola 10A40 MT (Tabela 8). Houve redução de 8% na porcentagem de germinação do genótipo Terola 10A40 UB e 7% para os genótipos Terola 10A40 SS e Hyola.

Sementes de soja tratadas com diferentes concentrações de pó nanoparticulado de prata (0, 100, 200, 400 e 800 mg L⁻¹) apresentaram 100% de germinação das sementes (PINHEIRO et al., 2008). Vale ressaltar, que diferentes espécies de plantas demonstram diferentes resistividade as nanopartículas, mas não se sabe exatamente como e por que isso ocorre (MA et. al, 2010).

A toxidez do nanocristal de prata às sementes de canola pode ter sido devido a superfície de contato da nanopartícula com a semente ou mesmo por causa da concentração utilizada.

- CHEN, C.; CHEN, Q.; SHI, M.; ZHOU, F.; HUA, C.; PANG, H. Nonstoichiometric Zinc Oxide Nanorod Arrays Doped Co or Ni as Effective Antimicrobial Materials. **Advanced Materials Research**, Switzerland, v. 518-523, p. 760-763, 2012.
- CUI, Y.; ZHAO, Y.; TIAN, Y.; ZHANG, W.; LU, X.; JIANG, X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. **Biomaterials**, Surrey, v.33, p. 2327-2333, 2012.
- DE GROOT, B. L.; GRUBMULLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. **Science**, New York, v. 294, p. 2353 - 2357, 2001.
- DU, W.; SUN, Y.; JI, R.; SHU, J.; WU, J.; GUO, H. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. **Journal of environmental monitoring: JEM**, Cambridge, v. 13, p. 822–828, 2011.
- FERRAZ, L.M. **Efeito de micro e nanopartículas de prata em *Physalis peruviana* L.** 2017, 65 f. (Mestrado em Engenharia de Biomateriais). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.
- FU, G.; VARY, P. S.; LIN, C. T. Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coatings. **Journal Physical Chemistry B**, Washington, v. 109, p. 8889–8898, 2005.
- GAO, Y, P.; YOUNG, L.; BONHAM-SMITH, P.; GUSTA, L. V. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, p. 635 - 644, 1999.
- GRUMEZESCU, A. M. **Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials**. 2016. Cap. 2, p. 29.
- HE, W.; KIM, H.K. WAMER, W.G.; MELKA, D.; CALLAHAN, J.H.; YIN, J.J. Photogenerated Charge Carriers and Reactive Oxygen Species in ZnO/Au Hybrid Nanostructures with Enhanced Photocatalytic and Antibacterial Activity. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 136, p. 750-757, 2014.
- IBM Corp, **IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0**. Armonk, New York, 2011.
- JAIN, N.; ASCOUGH, G. D.; STADEN, J. V. A smoke-derived butenolide alleviates HgCl₂ and ZnCl₂ inhibition of water uptake during germination and subsequent growth of tomato - Possible involvement of aquaporins. *Journal of Plant Physiology*, v. 165, p. 1422 - 1427, 2008.
- JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, v. 90, p. 301 - 313, 2002.

TABELA 8. Porcentagem de germinação de sementes de canola (*Brassica napus*), de diferentes genótipos, após tratamento com ZnO:11Ag. Uberlândia, MG, 2018.

| Porcentagem de germinação | | | | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|
| Tratamentos | Genótipos | | | |
| | Terola 10A40 UB | Terola 10A40 MT | Terola 10A40 SS | Hyola 61 |
| Testemunha | 53aC | 74aA | 64aB | 73aA |
| ZnO:11Ag | 45bD | 75aA | 57bC | 66bB |
| CV% | 9,13 | | | |

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

Para o índice de velocidade de emergência, a interação estatística entre os tratamentos e cultivares não foi significativa de acordo com o teste Tukey ($P > 0,05$). Contudo, houve diferença significativa entre os genótipos de canola (Tabela 9), onde o genótipo Terola 10A40 UB apresentou o menor índice de velocidade de emergência (5,59), diferindo estatisticamente dos demais. Resultados semelhantes também foram obtidos para a porcentagem de germinação do genótipo Terola 10A40 UB (53%), indicando que a semente pode apresentar baixa qualidade fisiológica, talvez devido a incidência de *Alternaria* spp e *Penicillium* spp.

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as sementes tratadas com ZnO:Ag (6,05) e as sementes não tratadas (9,51) no índice de velocidade de emergência. O tratamento das sementes com a nanopartícula de ZnO:Ag também foi fitotóxico para as plântulas de canola, assim como na germinação das sementes. Portanto, novos ensaios deverão ser conduzidos, avaliando diferentes concentrações do nanocristal no tratamento das sementes.

TABELA 9. Índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de genótipos de canola submetidas ao tratamento de ZnO:11Ag. Uberlândia, MG, 2017.

| Índice de velocidade de emergência | | | | |
|------------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Variável | Genótipos | | | |
| | Terola 10A40UB | Terola 10A40SS | Hyola 61 | Terola 10A40MT |
| IVE | 5,59b | 8,15 ^a | 8,99 ^a | 8,40a |
| | Tratamentos | | | |
| | ZnO:11Ag | | Testemunha | |
| | 6,05b | | 9,51 ^a | |
| CV% | 22,85 | | | |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey.

Na emergência de plântulas não houve interação significativa entre os fatores pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). No entanto, tanto os genótipos, quanto os tratamentos quando analisados isoladamente, apresentaram diferença estatística entre eles. Dessa forma, os genótipos Terola 10A40 SS, Terola 10A40MT e Hyola 61 obtiveram as maiores porcentagens de emergência, atingindo 77% de emergência. As sementes sem tratamento apresentaram maior porcentagem de emergência do que as sementes tratadas com nanocristal ZnO:11Ag. Assim sendo, o tratamento com o nanocristal pode ter sido tóxico para as sementes, devido ao tamanho das mesmas e concentração do produto usado.

TABELA 10. Porcentagem de emergência de plântulas de diferentes genótipos de canola, tratadas com nanocristal ZnO:11Ag ou não, em condições de casa de vegetação. Uberlândia, MG, 2017.

| Porcentagem de emergência de plântulas | | | | |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|----------|
| Variável | Genótipos | | | |
| | Terola 10A40 UB | Terola 10A40 SS | Terola 10A40 MT | Hyola 61 |
| % Emergência | 44,75 b | 68,00 a | 76,75 a | 75,50 a |
| | Tratamentos | | | |
| | ZnO:11Ag | | Testemunha | |
| | 54,75 b | | 77,75 a | |
| CV% | 21,64 | | | |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey.

O uso de nanopartículas de prata acarretou pouca ou nenhuma modificação na fisiologia das plantas de *Physalis*, independente da concentração (FERRAZ, 2017).

Os resultados obtidos neste trabalho, para o índice de velocidade de emergência e a porcentagem de plântulas emergidas, mostraram que o tratamento de sementes com a nanopartícula ZnO: Ag11% foi inferior à testemunha. As nanopartículas levam a formação de espécies reativas de oxigênio que podem danificar componentes celulares como proteínas, lipídeos e DNA, levando a morte celular (DU et al., 2011). O tamanho das nanopartículas interfere de maneira direta na sua eficácia, por possuírem, na maioria das vezes, tamanhos inferiores aos das membranas e organelas, permitindo, assim, a sua entrada nas células (MANKE et al., 2013).

Os nanocristais de prata utilizadas neste experimento apresentam um tamanho de 20 nm. Assim, os cristais de prata podem criar barreiras impedindo a entrada de água na semente, prejudicando a germinação e emergência de plântulas, devido a menor

atividade das aquaporinas, que são proteínas que formam poros facilitando a passagem da água para a semente (DE GROOT; GRUBMULLER, 2001).

As aquaporinas interferem em vários processos fisiológicos importantes na regulação do equilíbrio hídrico das plantas (KALDENHOFF et al., 2008) e também na germinação de sementes (WILLIGEN et al., 2006; LI et al., 2008; LIU et al., 2013). Para as sementes de canola, diferentes famílias de aquaporinas já foram expressas durante a germinação (GAO et al., 1999). Portanto, há a possibilidade da interação do nanocristal com a proteína, impedindo a absorção de água pela semente e, consequentemente, a germinação.

Íons de prata têm sido descritos como potente bloqueador de aquaporina *in vitro*, no entanto, seu modo de ação ainda é desconhecido (JAVOT; MAUREL, 2002; NIEMIETZ; TYERMAN, 2002). Entretanto, a inativação das aquaporinas pode ser reversível, pela utilização de agentes redutores, como o ditiotreitol. Diante disso, surge a possibilidade de tratar as sementes com nanopartículas de prata associadas ao ditiotreitol, para detectar se essas são realmente tóxicas, ou se quando associadas ao produto tem a capacidade de retornar a conformação e a funcionalidade das aquaporinas (JAIN et al., 2008), podendo, portanto, controlar patógenos, bem como não prejudicar as características fisiológicas de sementes de canola.

Dessa forma, fica evidente o efeito prejudicial dos nanocristais de prata utilizados neste experimento na emergência de plântulas de canola. Apesar dos resultados negativos encontrados para a qualidade fisiológica das sementes de canola tratadas com nanocristais de prata, este é um trabalho inédito na utilização de nanocristais no tratamento de sementes, necessitando de alguns ajustes em experimentos futuros.

4 CONCLUSÕES

O uso dos nanocristais de ZnO dopados com Ag, Au, Cu, Fe, Mn e Ni foi eficiente no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris in vitro* em diferentes concentrações. No entanto, o nanocristal ZnO:11Ag foi o que apresentou o maior halo de inibição. Não foi possível estimar o efetivo controle da bactéria nas sementes, devido à baixa taxa de infecção das mesmas.

O tratamento de sementes com ZnO:11Ag afetou a qualidade fisiológica de sementes de canola.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, L.K.; LYON, D.Y.; ALVAREZ, P.J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**, New York v. 40, p. 3527–3532, 2006.
- AHAMED, M.; ALHADLAQ, H.A.; KHAN, M.M.; KARUPPIAH, P.; ALDHABI, N.A. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. **Journal Nanomaterials**, [S.l.], v. 2014, p. 1-4, 2014.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 89, p. 1175–1186, 2010.
- ARAÚJO, J.A.M. **Nanopartículas, óleos essenciais e extratos vegetais no controle in vitro de fungos fitopatogênicos**. (Mestrado em Fitotecnia), 2014, 116 f. Departamento de Fitotecnia – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.
- AZAM, A.; AHMED, A.S.; OVES, M.; KHAN, M.S.; HABIB, S.S.; MEMIC, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v.7, p.6003-6009, 2012.
- BAI, H.; LIU, Z.; SUN, D.D. Hierarchical ZnO/Cu “corn-like” materials with high photodegradation and antibacterial capability under visible light. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, v.13, p.6205-6210, 2011.
- BELL, T. E. Understanding Risk Assessment of Nanotechnology. A Reporter's Guide to Sources and Research Issues. [S.l.], p.1-8, 2006. Disponível em: file:///C:/Users/XPS/Downloads/Understanding_Risk_Assessment.pdf. Acesso em: 22 jan. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes (RAS)**. Brasília: Mapa/Assessoria de Comunicação Social, 2009.
- BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, Washington v. 6, p. 866–870, 2006.
- BRINTHA, S.R. e AJITHA, M. Synthesis, Structural and Antibacterial Activity of Aluminium and Nickel Doped ZnO Nanoparticles by Sol-gel Method. **Asian Journal of Chemical Sciences**, [S.l.], v. 1(1), p. 1-9, 2016.
- CARREIRA, C. M.; PEREIRA, C. A.; BOMBANA, A. C.; JORGE, A. O. C. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**. Trabalho apresentado, São José dos Campos, 2009.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969-979, 1970.

KALDENHOFF, R.; RIBAS-CARBO, M.; FLEXAS, J.; LOVISOLO, C.; HECKWOLF, M.; UEHLEIN, N. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell & Environment*, v. 31, p. 658 - 666, 2008.

KARUNAKARAN, C. RAJESWARI, V.; GOMATHISANKAR, P. Antibacterial and photocatalytic activities of sonochemically prepared ZnO and Ag-ZnO. *Journal of Alloys and Compounds*, v.508, p.587-591, 2010.

KARUNAKARAN, C.; RAJESWARI, V.; GOMATHISANKAR, P. Optical, electrical, photocatalytic, and bactericidal properties of microwave synthesized nanocrystalline AgZnO and ZnO. **Solid State Sciences**, v. 13, p. 923-928, 2011.

KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicol In Vitro**, v. 23, p. 1116–1122, 2009.

KAUR, R. et al. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: A review. **Journal of Separation Science**, vol. 37, p. 1805 – 1825, 2014.

KUAN, T. L.; MINSAVAGE, G. V.; SCHAAD, N. W. Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, p. 409-413, 1986.

LI, G. W.; PENG, Y. H.; YU, X.; ZHANG, M. H.; CAI, W. M.; SUN, W. N.; SU, W. A. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, p. 1879 – 1888, 2008.

LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 45, p. 1977–1983, 2011.

LI, X. Z.; PLESAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.28, p.337-418, 2015.

LIMA, E.; GUERRA, R. LARA, V. GUZMAN, A. Gold nanoparticles as eficiente antimicrobial agnets for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. **Chemical Central Journal**, London, v.7, p.1-7, 2013.

LIU, C.; FUKUMOTO, T.; MATSUMOTO, T.; GENA, P.; FRASCARIA, D.; KANEKO, T.; KATSUHARA, M.; ZHONG, S.; SUN, X.; ZHU, Y.; IWASAKI, I.; DING, X.; CALAMITA, G.; KITAGAWA, Y. Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 63, p. 151 - 158, 2013.

MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3053-3061, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p.176-77, 1962.

MAHAPATRA, O.; BHAGAT, M.; GOPALAKRISHNAN, C.; ARUNACHALAM, K.D. Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. **Journal Experimental Nanoscience**, Abingdon, v.3, p.185-193, 2008.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-15, 2013.

MARINGONI, A. C. Doenças das Crucíferas. In: KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. **Agrônômica Ceres**, São Paulo, cap. 31, p. 285-291, 2005.

MASSOMO, S. M. S.; MABAGALA, R. B.; SWAI, I. S.; HOCKENHULL, J.; MORTENSEN, C. N. Evaluation of varietal resistance in cabbage against the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Tanzania. **Crop Protection**, Guildford, v.23, p.315-325, 2004.

MIGLIORINI, P. **Ocorrência e transmissão de *Alternaria* spp. em sementes de canola**. 2014, 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

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, v.16, p. 2346–2353, 2005.

MOTSHEKGAA, S. C. RAYA, S. S.; ONYANGO, M. S. Microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial activity of Ag/ZnO nanoparticles supported bentonite clay. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.262, p.439-446, 2013.

NIEMIETZ, C.M.; TYERMAN, S.D. New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 531, p. 443-447, 2002.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 1712–1720, 2007.

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 110, p. 16248– 16253, 2006.

PINHEIRO, F.C.; MEZACASA, A.; CAIRES, A.R.L. **Alteração do status fisiológico de plantas de soja induzido por nanopartículas de prata: avaliação via espectroscopia de fluorescência**. ENEPEX (Encontro de ensino pesquisa e extensão): 8º Enepe UFGD e 5º Epex UEMS. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2008.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, vol. 27, p. 1028-1029, 2004.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, Barretos, v. 5, p. 44-48, 2003.

RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a Review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 18, p. 89–108, 1999.

RAVICHANDRAN, K.; RATHIA, R.; BANETO, M.; KARTHIKA, K.; RAJKUMAR, P.V.; SAKTHIVEL, B.; DAMODARAN, R. Effect of Fe+F doping on the antibacterial activity of ZnO powder. **Ceramics International**, Oxford, v.41, p. 3390-3395, 2014.

REKHA K.; NIRMALA, M.; NAIR, M. G.; ANUKALIANI, A. Structural, optical, photocatalytic and antibacterial activity of zinc oxide and manganese doped zinc oxide nanoparticles. **Physica B: Condensed Matter**, Amsterdam, v. 405, p. 3180-3185, 2010.

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

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 803-809, 2004.

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, v. 29, p. 627–633, 1996.

SCHAAD, N. W. DIANESE, J. C. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 1215-1220, 1981.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; LACY, G.H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **APS Press**, Saint Paul, v.3, p.175-200, 2001.

SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 1518-1520, 1974.

SCHULTZ, T.; GABRIELSON, R. L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in western Washington crucifer seed fields: Occurrence and survival. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 1306-1309, 1986.

SEGALA, K.; BIZARRIA, M. T.; SILVA, A. S. F.; MARTINEZ, E. F.; MEI, L. H. I. **Estudo comparativo do efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata incorporadas em nanofibras eletrofiadas de quitosana/poli-óxido de etileno**. 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB), Natal, 2012.

SHEN, W.; FENG, L.; FENG, H.; KONG, Z.; GUO, M. Ultrafine silver(II) oxide particles decorated porous ceramic composites for water treatment. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 175, p. 592–599, 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assitat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal Agricultural Research**, [S.l.], v.11, p.3733-3740, 2016.

SINGH, S.; BARICK, K.C.; BAHADUR, D. Inactivation of bacterial pathogens under magnetic hyperthermia using Fe₃O₄-ZnO nanocomposite. **Powder Technology**, Lausanne, v. 269, p. 513-519, 2015.

TEBALDI, N.D.; PANIZZI, R.C. SADER, R. Detecção, Transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica das sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p. 290-293, 2007.

TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. 2007. Sistemas de Produção online. 2007. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf>. Acesso em: 20 de setembro, 2017.

TOMM, G. O.; WIETHÖLTER, S.; DALMAGO, G. A.; SANTOS, H. P. dos. **Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Embrapa Trigo, (Documentos Online, 113), Passo Fundo, 2009. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do113.htm>.

USMAN, M.S.; EL ZOWALATY, M.E.; SHAMELI, K.; ZAINUDDIN, N.; SALAMA, M.; IBRAHIM, N.A. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v.8, p.4467-4479, 2013.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 736–742, 1980.

WILLIGEN, C. V.; POSTAIRE, O.; TOURNAIRE-ROUX, C.; BOURSIAIC, Y.; MAUREL, C. Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, p. 1241 - 1250, 2006.

WU, H. Q. WEI, X. W.; SHAO, M. W.; GU, J. S.; QU, M. Z. Synthesis of copper oxide nanoparticles using carbono nanotubes as templates. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v.364, p. 152-156, 2002.

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

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**, Dordrecht, v. 9, p. 479–489, 2007.

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**, Dordrecht, v. 9, p. 479–489, 2007.

ZHANG, L.; DING, Y. POVEY, M.; YORK, D. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent. **Progress in Natural Science**, [S.l.], v. 18, p. 939-944, 2008.