



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

NATÁLIA SILVA OLIVEIRA

NANOPARTÍCULAS DE SIMONKOLLEITE PURAS E DOPADAS COM PRATA
E COBRE NO CONTROLE DE *Xanthomonas* spp. EM TOMATEIRO

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2020

NATÁLIA SILVA OLIVEIRA

NANOPARTÍCULAS DE SIMONKOLLEITE PURAS E DOPADAS COM PRATA
E COBRE NO CONTROLE DE *Xanthomonas* spp. EM TOMATEIRO

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

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 Oliveira, Natália Silva, 1987-
2020 Nanopartículas de Simonkolleite puras e dopadas com prata e cobre no controle de Xanthomonas spp. no tomateiro. [recurso eletrônico] / Natália Silva Oliveira. - 2020.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Agronomia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.76>
Inclui bibliografia.

1. Agronomia. I. Tebaldi, Nilvanira Donizete, 1970-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado 005/2020 PPGAGRO				
Data:	Dezessete de fevereiro de dois mil e vinte	Hora de inicio:	09:00	Hora de encerramento:	[12:25]
Matrícula do Discente:	11812AGR020				
Nome do Discente:	Natália Silva Oliveira				
Título do Trabalho:	Nanopartículas de Simonkolleite puras e dopadas com prata e cobre no controle de <i>Xanthomonas spp.</i> no tomateiro.				
Área de concentração:	Fitopatologia				
Linha de pesquisa:	Controle e Manejo Integrado de Doenças				

Reuniu-se na sala 212, bloco 1CCG, Campus Glória, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Alison Tassis Martins Lima - UFU; Bruno Sérgio Vieira - UFU; Anielle Christine Almeida Silva - UFA; Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Nilvanira Donizete Tebaldi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Últimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por Nilvanira Donizete Tebaldi, Professor(a) do Magistério Superior, em 17/02/2020, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Alison Talis Martins Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/02/2020, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Sergio Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/02/2020, às 12:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anielle Christine Almeida Silva, Usuário Externo**, em 17/02/2020, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1796588** e o código CRC **64CFA4A0**.

Aos meus pais e família.

Aos meus filhos, Arthur e Júlia, que são o sentido do meu existir.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a essa força motora a que chamo de Deus, pela motivação nos momentos difíceis e suporte durante a jornada.

Aos meus pais, Antônio e Carmen, pela condução, exemplo e apoio sempre a mim concedidos.

Aos meus irmãos com muito carinho, pela preocupação e auxílio constantes.

Aos meus filhos, pela compreensão nas horas dedicadas ao trabalho em que não pudemos brincar juntos.

À minha orientadora Nilvanira, pela paciência e tempo dedicados a mim, pelo aceite em trabalhar junto, e por todo o engrandecimento profissional que me proporcionou.

Aos Professores Alison, Anielle e Bruno que tão gentilmente se dispuseram a fazer parte da defesa e contribuir com o trabalho.

Às minhas indispensáveis companheiras de trabalho, que de uma maneira tão carinhosa me auxiliaram dia a dia durante esta etapa, Fabiana, Lara e Raquel, sem vocês a caminhada teria sido mais difícil e menos divertida.

Aos técnicos Júlia e Roberto, por se prontificarem a me auxiliar sempre que necessário.

À professora Anielle, em conjunto ao Laboratório de Física da Universidade Federal de Uberlândia pela síntese dos materiais para a elaboração do trabalho.

Ao ICIAG e Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia. Agradeço imensamente a oportunidade.

RESUMO

A mancha bacteriana, causada por quatro espécies de *Xanthomonas* spp. (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*), tem difícil controle devido à baixa eficácia dos produtos disponíveis. Há portanto, necessidade de se buscar alternativas eficazes e viáveis economicamente para o controle dos patógenos. As nanopartículas são moléculas de tamanho nanométrico, que possuem facilidade em se ligar à parede celular da bactéria e atingir o ambiente intracelular de maneira mais eficaz. O trabalho objetivou avaliar nanopartículas (NPs) de simonkolleite (SM) puras e dopadas com prata (Ag) ou cobre (Cu), nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 wt%, no controle de *Xanthomonas* spp. em tomateiro. A toxidez das nanopartículas de simonkolleite puras e dopadas foram avaliadas na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*, através do halo de inibição. Avaliou-se a redução do desenvolvimento bacteriano com relação ao tempo de contato entre nanopartícula e bactéria. Nas sementes tratadas, foram avaliadas as porcentagens de germinação e a detecção de bactérias nas sementes. Plantas de tomate inoculadas com *Xanthomonas* spp. foram mantidas em casa de vegetação e avaliou-se a severidade da doença sob tratamento preventivo e curativo com as NPs de SM puras e dopadas com 0,1Ag e 1 Cu. *In vitro*, as NPs de SM:5Ag obtiveram melhor desempenho que o antibiótico cefalexina. No tempo de 5 h de contato entre nanopartículas e bactérias, o desenvolvimento bacteriano decaiu de 10^8 UFC.mL⁻¹ para 120, 12 e 8 UFC.mL⁻¹ nos tratamentos com NPS de SM puras e dopadas com 0,1Ag e 1Cu, respectivamente. O teste de germinação não apontou diferenças entre a porcentagem de germinação das sementes tratadas e da testemunha. Em casa de vegetação, nas concentrações de 5 mg.mL⁻¹, o desempenho das NPs de SM dopadas foi igual ao do hidróxido de cobre de maneira preventiva, e superior no tratamento curativo.

Palavras-chave: Doenças bacterianas, mancha bacteriana do tomateiro, nanotecnologia, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

The tomato bacterial leaf spot, caused by four species of *Xanthomonas* spp. (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* and *X. perforans*), is difficult to control due to the low effectiveness of the available products. Therefore, there is a need to seek effective and economically viable alternatives for the control of pathogens. Nanoparticles are molecules of nanometric size, which are easily attached to the bacterium's cell wall and reach the intracellular environment more effectively. The work aimed to evaluate pure and doped nanoparticles (NPs) of simonkolleite (SM) with silver (Ag) or copper (Cu), in concentrations of 0.1; 1; 5 and 10 wt%, in the control of *Xanthomonas* spp. in tomato. The toxicity of pure and doped simonkolleite nanoparticles was evaluated in the inhibition of bacterial growth in vitro, through the inhibition halo. The reduction in bacterial development was evaluated in relation to the contact time between nanoparticles and bacteria. In the treated seeds, the germination percentages and the detection of bacteria in the seeds were evaluated. Tomato plants inoculated with *Xanthomonas* spp. they were kept in a greenhouse and the severity of the disease was evaluated under preventive and curative treatment with pure NPs of SM and doped with 0.1Ag and 1 Cu. In vitro, NPs of SM: 5Ag performed better than the antibiotic cephalexin. In the time of 5 h of contact between nanoparticles and bacteria, the bacterial development decreased from 108 UFC.mL⁻¹ to 120, 12 and 8 UFC.mL⁻¹ in the treatments with pure SM NPS and doped with 0.1Ag and 1Cu, respectively. The germination test did not show differences between the germination percentage of the treated seeds and the control. In the greenhouse, at concentrations of 5 mg.mL⁻¹, the performance of the doped SM NPs was equal to that of copper hydroxide in a preventive manner, and superior in curative treatment.

Palavras-chave Bacterial diseases, bacterial tomato leaf spot, nanotechnology,
Solanum lycopersicum

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. Preparo da suspensão bacteriana	4
2.2. Inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	4
2.3. Tempo de exposição de nanopartículas à suspensão bacteriana	5
2.4. Detecção de <i>Xanthomonas</i> spp. em sementes de tomate	5
2.5. Germinação de sementes de tomate tratadas com nanopartículas de Simonkolleite	6
2.6. Controle da mancha bacteriana do tomateiro com nanopartículas em casa de vegetação	6
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
3.1. Inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	7
3.2. Tempo de exposição de nanopartículas à suspensão bacteriana	9
3.3. Detecção de <i>Xanthomonas</i> spp. em sementes de tomate	11
3.4. Germinação de sementes de tomate tratadas com nanopartículas de Simonkolleite	11
3.5. Controle da mancha bacteriana do tomateiro com nanopartículas em casa de vegetação	12
4. CONCLUSÃO	14
5. REFERÊNCIAS	15

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma planta da América do Sul, mais precisamente da região dos Andes, e se estabeleceu de forma global, adquirindo enorme importância comercial no mundo (CURRENCE, 1963). O Brasil encontra-se na nona posição mundial dos países produtores do fruto, representando 2,5% do total de tomateiros plantados no mundo, o que corresponde a 64,4 mil hectares anuais da cultura (IBGE, 2019).

Muitos são os patógenos que prejudicam a cultura e reduzem a produtividade e qualidade do fruto. Dentre as principais doenças da cultura está a mancha bacteriana do tomateiro, causada por quatro espécies de *Xanthomonas*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans* (JONES, 2004). A doença pode levar à perdas de até 52% na produção, sob condições favoráveis com temperaturas entre 20° e 30° C e período de molhamento foliar acima de 4 h (QUEZADO-SOARES et. al., 1999).

O controle da mancha bacteriana é dificultado devido à restrita disponibilidade de moléculas registrados para a cultura, à escassez de variedades resistentes, à rápida disseminação do patógeno na lavoura em condições favoráveis à doença e transmissão da bactéria por sementes infectadas (NASCIMENTO, 2013).

O manejo da mancha bacteriana na cultura do tomateiro é realizado em sua maioria pela utilização de produtos à base de cobre. Warnes e Keevil (2016), demonstraram que bactérias do tipo MRSA (*Staphylococcus aureus*) em contato com superfícies de aço inoxidável permanecem vivas, enquanto em superfícies de cobre há redução de 4 log nas UFC em apenas 15 minutos de contato. Devido à vasta gama de microrganismos sensíveis ao ataque do óxido de cobre, ele pode ser considerado um produto com alto potencial antimicrobiano (ESPITIA et al., 2012).

Mesmo que afirmado o potencial tóxico de um elemento às bactérias, a formulação do produto final é extremamente relevante para que haja a eficácia adequada. Os produtos à base de cobre presentes no mercado possuem ação de contato devido ao tamanho das partículas, formulações e insolubilidade dos produtos (NASCIMENTO, 2013). Se houverem formas de sintetizar produtos de alta solubilidade cujas partículas possuam maiores superfícies de contato, promovendo uma possível ação sistêmica, mesmo que parcial, provavelmente alcançaríamos maiores períodos de proteção das plantas e maior eficácia fitossanitária.

A nanotecnologia vem sendo empregada em diversas áreas de estudo, e para a microbiologia vegetal desponta como alternativa fitossanitária (WANG et. al, 2014).

No método físico, a síntese dos materiais passa por processos de redução de tamanho, tais como moagem, têmpera, irradiação entre outros. No processo químico, as nanopartículas são formadas através de reações químicas entre íons e moléculas, enquanto o processo biológico se dá através da utilização de bactérias e fungos, porém o rendimento é bem inferior ao do método químico (RAI, 2003).

Na síntese das nanopartículas existe a possibilidade de incorporação de moléculas na superfície do nanocristal, adicionando novas propriedades, que podem ser ópticas, magnéticas, elétricas, entre outras. Este processo é denominado de dopagem (MENJOGE, 2010).

O efeito bactericida das nanopartículas de ZnO tem sido relacionado ao tamanho diminuto e alta superfície de absorção, o que permite a interação com as membranas microbianas (RUPARELIA et. al., 2008). A nível intracelular, há um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em contato com a membrana celular bacteriana, resultando na ruptura da mesma, consequentemente na morte do microrganismo (WANG et. al, 2014). O uso dos nanocristais de ZnO dopados com Ag, Au, Cu, Fe, Mn e Ni foram eficientes no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *in vitro* em diferentes concentrações (ZANCAN, 2018).

O hidróxido cloreto de zinco monohidratado, também conhecido como Simonkolleite ($Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot H_2O$)(SM) é um material formado pela corrosão de zinco na forma de cristais de plaquetas micro hexagonais, e sua utilização está relacionada ao seu poder eletroquímico, devido às vacâncias de oxigênio na superfície, aumentando consideravelmente a condutividade. O seu uso bactericida se dá a partir das vacâncias de oxigênio na superfície deste material (TAVARES, 2013).

A propriedade bactericida de nanopartículas de prata depende da sua estabilidade, do seu estado de aglomeração, tamanho e forma, sendo que tais fatores interferem na sua interação com a bactéria, aumentando ou reduzindo seu potencial tóxico (PAL et al., 2007). Segundo Allaker (2010), o tamanho das nanopartículas proporciona maior interação com as membranas dos microrganismos, o que confere a elas capacidade biocida.

O processo de intoxicação das bactérias pelas nanopartículas de prata se dá devido à liberação de íons Ag^+ que interagem com grupos tiol em proteínas bacterianas dificultando a cadeia respiratória, ou interagem com o DNA bacteriano, prejudicando a

regulação gênica alterando a replicação do DNA da bactéria (MARINI et al., 2007), reduzem a produção de ATP e resultam em espécies reativas de oxigênio, que desconfiguram a parede celular do microrganismo, causando ruptura e morte (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010).

Nanopartículas de prata foram utilizadas na área médica no controle de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (MOHR et al., 2017), na tecnologia de alimentos produzindo biofilmes que aumentam a durabilidade e a segurança alimentar contra *Salmonella* (SOZER; KOKINI, 2009) e em *Escherichia coli* no tratamento de água e efluentes (CARA et al., 2016), com função de eliminar os microrganismos indesejáveis.

A prata é o elemento mais utilizado na síntese de nanopartículas com função antimicrobiana, devido à quantidade de estudos e comprovada eficácia, contudo, este elemento é um metal pesado e se empregado em larga escala em lavouras poderia desencadear um excesso de prata no solo e afetar todo o ciclo hídrico contaminando lençóis freáticos (JONES, 2010). O solo, devido à sua capacidade tampão e funcionalidade de filtrar e absorver contaminantes acaba por encobrir os danos que serão muitas vezes detectados em estágios avançados de contaminação (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2000).

Em contrapartida a utilização de Cu como elemento de dopagem das nanopartículas, haja vista sua comprovada ação antimicrobiana a uma vasta gama de patógenos, poderia ser alternativa inovadora, tanto no quesito econômico, com a síntese de nanopartículas mais baratas, gerando produtos de menor custo, quanto na contaminação ambiental, de modo que o Cu é um elemento utilizado para nutrição das plantas sendo absorvido pelas mesmas. Estudos de Simonkolleite com efeitos bactericidas ainda não são reportados na literatura, sendo mais um motivo para o desenvolvimento do presente trabalho. Em contrapartida, o grupo de estudos sobre o controle de doenças bacterianas através da utilização de nanopartículas formado na Universidade Federal de Uberlândia, coordenado pela Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi vem trabalhando de forma intensa em pesquisas para que as aplicações das nanopartículas com essa finalidade tenham maior respaldo científico.

Sendo assim, os objetivos do trabalho a partir da aplicação das nanopartículas foram: i) avaliar a inibição do crescimento de *Xanthomonas* spp. *in vitro*, ii) a redução de desenvolvimento de *Xanthomonas* spp. em plantas de tomate e iii) o efeito das nanopartículas de ZnOCl sobre a germinação das sementes de tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC) e Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de janeiro a outubro de 2019.

2.1. Preparo da suspensão bacteriana

O isolado UFU A35 de *Xanthomonas* spp., foi cultivado em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970). A suspensão bacteriana foi preparada em solução de NaCl (0,45%) e ajustada em espectrofotômetro ($OD_{550}=0,5$) para a concentração de 1×10^9 UFC mL $^{-1}$ (MARCUZZO et al., 2009).

2.2. Inibição de crescimento bacteriano *in vitro*

O teste de difusão em disco (BAUER et al., 1966) é uma das formas mais confiáveis e simplificadas de determinar a sensibilidade dos microrganismos bacterianos a produtos com ação bactericida.

Para a avaliação do halo de inibição do crescimento de *Xanthomonas* spp. *in vitro* foram utilizadas nove nanopartículas (SM puro e SM dopado com Ag ou Cu, nas concentrações 0,1; 1; 5 e 10).

Para o preparo da solução foi utilizada água estéril e as nanopartículas na concentração de 0,01 g.mL $^{-1}$ e diluições de 10^{-1} a 10^{-3} . Como controle negativo e positivo, foram utilizadas soluções de NaCl 0,45% e cefalexina a 500 µg.L $^{-1}$ respectivamente.

Inicialmente uma camada básica de meio ágar-água (2%) e em seguida outra camada contendo meio nutritivo semissólido (0,8%) acrescida de 10% da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL $^{-1}$), foram vertidas em placas de Petri. Posteriormente, 6 discos de papel de filtro esterilizados, de 7 mm de diâmetro foram colocados sobre o meio e cada um foi embebido com 10 µl da nanopartícula não diluída e suas diluições, com cefalexina e solução de NaCl (0,45%). Após 48h de incubação em estufa à 28°C, foi observada a presença ou não do halo de inibição.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado sob esquema fatorial (9x3) +2, sendo nove nanopartículas, três diluições e dois controles. Os dados foram comparados através da análise de variância pelo teste de Tukey a 5%.

2.3. Tempo de exposição de nanopartículas à suspensão bacteriana

As nanopartículas que deram continuidade aos próximos testes foram selecionadas seguindo alguns critérios. Foram selecionadas nanopartículas de SM puro, de forma a avaliar a função da dopagem e dopadas com Ag e Cu nas menores concentrações que produziram resultados satisfatórios de controle. Para realização dos próximos experimentos foram selecionadas as nanopartículas SM e SM dopadas com 0,1Ag ou 1,0 Cu.

Em cada tubo de 2 mL esterilizado foi adicionada uma alíquota de 900 µL da solução de nanopartículas a 0,01 g.mL⁻¹ e 100 µL da suspensão bacteriana (10⁸ UFC.mL⁻¹). Posteriormente, em triplicata, alíquotas de 100 µL foram cultivadas em placas de Petri, contendo o meio de cultura 523, imediatamente, uma, duas, três, quatro e cinco horas após a exposição. As placas foram incubadas em estufa à 28º C por 72h e avaliado o número de UFC mL⁻¹.

2.4. Detecção de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate

Para detecção de *Xanthomonas* spp. foram utilizadas 200 sementes do tomate Santa Cruz Kada, sendo 100 sementes inoculadas e 100 sementes sem inoculação. As sementes a serem inoculadas estavam armazenadas em placas de Petri em 25 unidades por repetição e sobre elas foi vertida uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana (10⁸ UFC.mL⁻¹), e sobre as que não seriam inoculadas 100 µL de água estéril. Após 30 minutos as sementes foram retiradas da placa, secas em papel filtro e tratadas. Cada um dos tratamentos se deu por sua respectiva nanopartícula (SM, SM 0,1 Ag ou 1,0 Cu) e NaCl (0,45%), usando 100 µL de solução por 10 minutos. As sementes foram novamente secas e posteriormente colocadas sob meio semi-seletivo NSCAA (SCHAAD et al., 2001) em placas de Petri e incubadas a 28º C por 72 horas. Foi avaliada a porcentagem de sementes com a presença de *Xanthomonas* spp. através das colônias amareladas características. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste Tukey a 5% de significância.

2.5. Germinação de sementes de tomate tratadas com nanopartículas de Simonkolleite

Para a avaliação da germinação das sementes tratadas com as nanopartículas SM, SM 0,1Ag e SM 1Cu foi utilizado o teste de papel mata borrão. Foram utilizadas 200 sementes para cada tratamento, distribuídas em quatro caixas tipo “gerbox” com 50 sementes cada. As sementes foram dispostas sob camada dupla de papel mata borrão embebido em água, equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco e na BOD, à temperatura de 20ºC ±1 (BRASIL, 2009). As contagens de plântulas emergidas se deram aos cinco e quatorze dias após a incubação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sob fatorial 4x2 (3 nanopartículas + testemunha x inoculadas e não inoculadas), e os dados foram comparados pelo teste de Tukey 5%.

2.6. Controle da mancha bacteriana do tomateiro com nanopartículas em casa de vegetação

O ensaio foi realizado em casa de vegetação, onde plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada foram cultivadas em vasos com capacidade de 500 mL, em substrato composto por solo, areia, húmus e vermiculita (4:1:1:1). Após 15 dias da semeadura, as plantas com três a quatro folhas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento. No controle preventivo, com as nanopartículas SM, SM 0,1Ag e SM 1Cu, nas concentrações 2,5 e 5 mg.mL⁻¹, com hidróxido de cobre (2 g.L⁻¹) e água estéril (testemunha). Dois dias após, as plantas foram inoculadas via pulverização das folhas com a suspensão bacteriana na concentração de 10⁷ UFC.mL⁻¹.

No controle curativo, as plantas foram inoculadas com a suspensão bacteriana na concentração descrita anteriormente, e dois dias após, foram pulverizadas com as nanopartículas, hidróxido de cobre e água. As plantas pulverizadas com água foram consideradas testemunhas. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, antes e após a inoculação.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial, composto de 2 controles (preventivo e curativo), 4 produtos (3 nanopartículas e água) e 2 concentrações de nanopartículas (2,5 e 5 mg.mL⁻¹), com quatro repetições, sendo considerada com unidade experimental, um vaso contendo 3 plantas.

A severidade da doença foi avaliada empregando-se a escala diagramática, aos 3,6,9,12 e 15 dias após a inoculação (MELLO et al., 1997).

A Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) foi calculada pela fórmula; AACPD = $\sum((Y_i + Y_{i+1})/2)(t_{i+1} - t_i)$, onde: Y é a intensidade da doença (nota atribuída de acordo com a escala diagramática usada); t é o tempo (intervalo entre as avaliações, em dias); e i representa o número de avaliações no tempo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Inibição do crescimento bacteriano *in vitro*

As nanopartículas de SM dopadas com diferentes porcentagens de prata (Ag) e cobre (Cu) inibiram o crescimento de *Xanthomonas* spp. *in vitro* (Tabela 1), diferindo significativamente do NaCl e da cefalexina. Os halos de inibição de crescimento da *Xanthomonas* spp. evidenciam que existe controle da população bacteriana no meio, determinando que as moléculas empregadas possuem efeito tóxico a *Xanthomonas* spp. (Tabela 1).

A interação entre os fatores nanopartícula e diluição ($P < 0,05$) foi significativa, ou seja, o controle bacteriano é maior à medida que se aumenta a concentração da nanopartícula utilizada, dentro do intervalo de concentração aplicado no estudo.

Quando comparadas as nanopartículas sem diluição, as de Ag nas concentrações 0,1; 5 e 10 e de Cu 1 e 10, resultaram em melhores índices de controle, sendo que Ag 10 superou inclusive a cefalexina, e sob a mesma condição o SM puro apresentou o menor halo de inibição, o que reforça a teoria de que o potencial de controle microbiano das nanopartículas é maior quando elas são dopadas.

Li et al. (2015), utilizaram nanopartículas de ZnO dopado com Ag, em diferentes concentrações, cujos desempenhos foram superiores ao ZnO puro no controle de *Escherichia coli*.

Na diluição de 10^{-1} a nanopartícula de SM 5Ag se destacou em relação aos demais tratamentos, seguido de 0,1 Ag, 10 Ag e 1 Cu. Nesta mesma diluição, os halos de inibição das nanopartículas de Ag 5 e Ag 10 se igualaram ao halo de cefalexina. O controle com antibiótico é utilizado como padrão de melhor desempenho no controle bacteriano, e

moléculas que alcancem o mesmo patamar de controle, possuem potencial para tornarem-se produtos eficazes na redução bacteriana. Consegue-se perceber, portanto, no caso do cobre, que a relação entre a concentração do elemento dopante não é diretamente proporcional ao efeito tóxico que a nanopartícula pode causar na bactéria, provavelmente a forma e a estruturação do nanocrystal sejam mais relevantes do que a própria concentração em si.

As nanopartículas de cobre apresentam alta eficiência no controle bacteriano, e o efeito pode ser consequência da liberação de espécies reativas de oxigênio, que culminam na destruição das membranas e podem causar danos ao DNA bacteriano, e inclusive as nanopartículas sintetizadas com núcleo metálico em cobre são menos onerosas que as produzidas com metais como prata e ouro (AHAMED, 2014).

Na diluição 10^{-2} a nanopartícula de melhor tratamento foi Ag 10, sendo todas as demais nanopartículas iguais entre si, e na diluição 10^{-3} as nanopartículas igualaram-se entre si e com a solução de NaCl. Portanto, quanto maior for a diluição, menor será a taxa de controle empregada pela molécula.

Tabela 1. Halo de inibição (mm) do crescimento de *Xanthomonas* spp., por nanopartículas de SM dopado com Ag e Cu, em diferentes diluições e concentrações, em meio de cultura. Uberlândia, MG, 2019.

Nanocristais	ND	Diluição		
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
SM: Ag 0,1	39,4 abA ⁺	21,8 bB* ⁺	10,2 bC* ⁺	3,1 aD*
Ag 1	20,4 cA ⁺⁺	9,9 cB ⁺⁺	6,5 bcB* ⁺	0 aC*
Ag 5	45,5 abA ⁺	38,2 aB ⁺	10,7 bC* ⁺	4,0 aD*
Ag 10	51,0 aA ⁺⁺	28,4 bB ⁺	17,4 aC* ⁺	5,0 aD*
Cu 0,1	31,5 bA ⁺	15,6 cB* ⁺	9,8 bB* ⁺	4,0 aC*
Cu 1	41,7 abA ⁺	21,1 bcB* ⁺	10,4 bC* ⁺	0,0 aD*
Cu 5	28,2 bA ⁺	12,3 cB* ⁺	9,9 bB* ⁺	2,0 aC*
Cu 10	42,2 abA ⁺	9,4 cB* ⁺	6,0 bcB* ⁺	2,4 aC*
SM	18,0 cA ⁺⁺	8,3 cB* ⁺	6,5 bcB* ⁺	0,0 aC*
Cefalexina	33,5			
NaCl	0,0			

CV(%)	23,58
-------	-------

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

Cefalexina* e NaCl⁺: Médias comparadas às testemunhas são significativas pelo teste de Dunnet a 0,05 de significância.

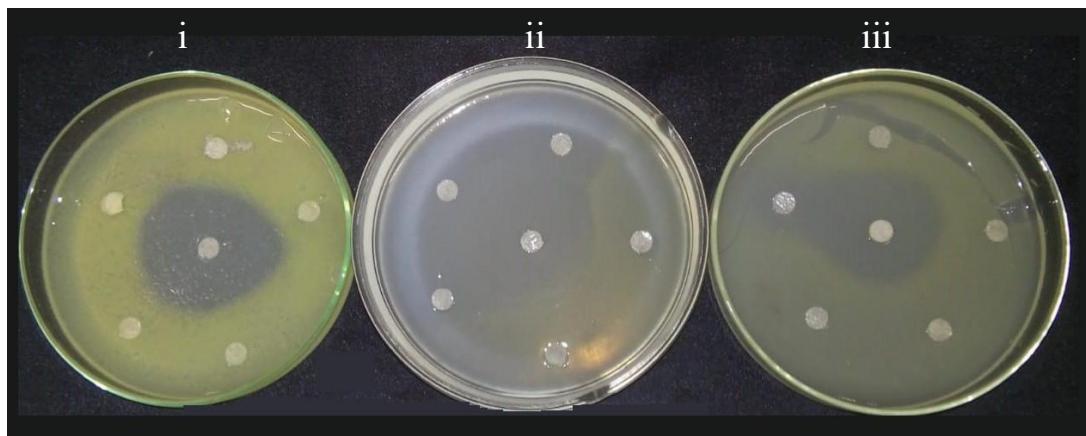


Figura 1. Halos de inibição de crescimento de *Xanthomonas* spp. por nanopartículas de SM dopados com (i) Ag 0,1, (ii) Cu 1 e SM sem dopagem (iii). Uberlândia – MG, 2019.

Mamede (2018) observou que nanocristais de ZnO dopados com Cu e Ag apresentaram inibição bacteriana sobre *Pantoea ananatis* *in vitro*.

A partir da verificação do poder antibacteriano das nanopartículas *in vitro*, foi necessário avaliar se as nanopartículas em contato com as sementes não causariam prejuízo à germinação, ou mesmo, se a aplicação das nanopartículas em plantas de tomateiro inoculadas, surtiriam efeito sobre o patógeno e não causariam danos às plantas.

3.2. Tempo de exposição de nanopartículas à suspensão bacteriana

O crescimento das colônias reduziu bruscamente após o contato das bactérias com as nanopartículas SM, 0,1 Ag e 1 Cu durante o prazo de 5 horas. As nanopartículas possuem maior facilidade de entrada na membrana celular bacteriana, porém, há necessidade de um intervalo de contato entre nanopartícula e bactéria para a penetração da mesma na região intracelular (GRUMEZESCU, 2016). Quanto maior foi o tempo de contato entre células bacterianas e suspensão de nanopartículas, menor foi o desenvolvimento de colônias de *Xanthomonas* spp.

Para aplicação de produto em áreas agrícolas, deve-se considerar a necessidade de absorção do mesmo em tempos menores possíveis, considerando a necessidade de irrigação, principalmente no cultivo do tomate, ou molhamento por chuva. Portanto quanto menor o tempo necessário para ser efetivo e absorvido pela planta, maior o potencial como produto fitossanitário.

Nota-se que o efeito de inibição do crescimento bacteriano pela nanopartícula pura (SM), foi inferior ao obtido pelas nanopartículas dopadas, tanto pela prata quanto pelo cobre, reiterando a teoria da maior efetividade através da dopagem.

No tempo de 5 h de contato entre nanopartículas e bactérias, o desenvolvimento bacteriano reduziu de 10^8 UFC.mL⁻¹ para 120, 12 e 8 UFC.mL⁻¹ nos tratamentos com SM pura, e dopada com 0,1 Ag e 1 Cu, respectivamente.

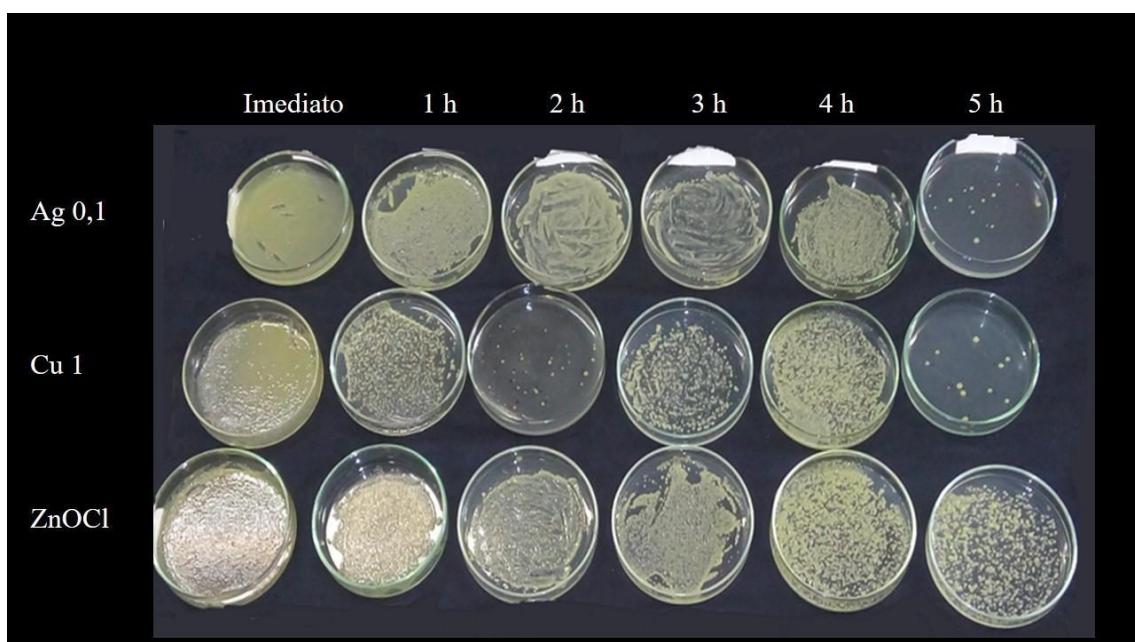


Figura 2. Viabilidade de colônias bacterianas de *Xanthomonas* spp. tratada com nanopartículas de SM pura e dopada com Ag e Cu, em diferentes tempo de exposição. Uberlândia-MG, 2019.

A prata é um elemento que apresenta alta atividade antimicrobiana, tanto para bactérias quanto para fungos, sendo que tal capacidade é potencializada quando em nanopartículas (PANACEK et al., 2006).

O óxido de zinco (ZnO) não inibiu o crescimento *in vitro* de *Pantoea ananatis*, em contrapartida sua forma dopada na concentração de 0,5 Fe teve ação inibitória (MAMEDE, 2018), seguindo o mesmo padrão do presente estudo, em que os potenciais de controle bacteriano da nanopartícula SM foram inferiores àqueles alcançados pela utilização da molécula dopada por Ag ou Cu, nas mesmas concentrações.

3.3. Detecção de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate

Sementes de tomate contaminadas por fitobactérias podem resultar em severas epidemias tanto no viveiro de mudas quanto em campo, mesmo quando em baixas proporções segundo Carmo et al. (1996) que constataram que sementes de pimentão apresentando 0,01% de contaminação por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* resultaram na contaminação de 100% das mudas em viveiro em 30 dias após plantio.

O controle de doenças bacterianas a partir do tratamento de sementes é uma opção de manejo que previne a redução do stand e melhora a performance da plântula, iniciando o ciclo de vida da planta com maior sanidade e melhores condições produtivas (CARMO et al., 1996).

Em todos os tratamentos utilizando nanopartículas de SM, as porcentagens de detecção de *Xanthomonas* spp. foram semelhantes entre si e inferiores ao tratamento com NaCl (Tabela 2). Vale ainda ressaltar que na inoculação das sementes a concentração da suspensão bacteriana é extremamente elevada se comparado às condições à que as sementes serão submetidas à campo.

Nos tratamentos onde as sementes não foram inoculadas não houve aparecimento de colônias bacterianas (Tabela 2).

3.4. Germinação de sementes de tomate tratadas com nanopartículas

Na elaboração de moléculas com finalidade fitossanitária, é necessário avaliar o comportamento não só dos microrganismos estudados, bem como dos materiais vegetais nos quais essas moléculas serão empregadas. Não é viável a utilização de um produto que extermine a doença da lavoura, mas que em contrapartida cause prejuízos aos organismos vegetais ou ao ambiente. Desse modo, a avaliação da germinação foi utilizada como parâmetro para verificar possíveis danos às sementes na utilização das nanopartículas.

Observa-se portanto, que não houve diferença na porcentagem de germinação entre as sementes tratadas e não tratadas, ou seja, a aplicação das nanopartículas de SM pura e dopadas com 0,1Ag ou 1Cu não causou prejuízo à germinação das sementes (Tabela 2), ao mesmo instante em que houve redução na porcentagem de detecção de bactérias quando da aplicação das nanopartículas.

Tabela 2. Detecção de *Xanthomonas* spp. e germinação de sementes de tomates, tratadas com diferentes nanopartículas. Uberlândia – MG, 2019.

Nanocristais	Detecção (%)		Germinação (%)		Média
	Inoculadas	Não inoculadas	Inoculadas	Não Inoculadas	
NaCl	98 bB	0 aA	97	96	97a
SM 0,1Ag	81 aB	0 aA	95	97	96a
SM	87 aB	0 aA	96	94	95a
SM 1,0Cu	85 aB	0 aA	97	96	97a
Média	88B	0A	96A	96A	
CV(%)	52		16		

Médias seguidas por letras maiúsculas na linha ou minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5% de significância.

O tratamento utilizando nanopartículas de ZnO 11Ag, visando controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*., apresentou prejuízo na taxa de germinação de canola (ZANCAN et al., 2018), diferindo do resultado encontrado com o SM 0,1Ag descrito neste trabalho (ZANCAN et al., 2018).

3.5. Controle da mancha bacteriana do tomateiro com nanopartículas em casa de vegetação

Houve interação significativa entre os fatores tipos de tratamentos, se curativo ou preventivo, e concentração das nanopartículas ($P < 0,05$) (Tabela 3). Nos tratamentos com menor concentração ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), o manejo preventivo gerou melhores resultados que o tratamento curativo (Tabela 3).

No tratamento preventivo, apenas a nanopartícula pura SM na concentração de 5 mg.ml^{-1} se igualou à performance da testemunha, com menor eficiência de controle. As

demais nanopartículas tiveram efeito semelhante ao hidróxido de cobre, produto comercial utilizado com finalidade de controle bacteriano.

Avaliando o hidróxido de cobre como produto protetivo, com ação de contato e baixa permanência foliar, principalmente em épocas de alta precipitação e irrigação como no caso das plantas de tomateiro em casa de vegetação, verificou-se o melhor desempenho em tratamento preventivo. No tratamento preventivo, quando foi realizada a inoculação por aspersão, já existia nas folhas um filme tóxico formado pelo hidróxido de cobre, de modo que quando as bactérias entraram em contato com a folha tiveram contato também com o produto. Em contrapartida, no tratamento curativo, quando foi realizada a aplicação do produto dois dias depois, uma parte das bactérias já havia atingido o ambiente intracelular, e como o hidróxido de cobre não é absorvido pela planta, elas tiveram maiores possibilidades de colonizar e se desenvolver.

No tratamento curativo, apenas as nanopartículas SM Ag 0,1 e Cu 1 nas concentrações de 5 mg.mL^{-1} obtiveram efeitos superiores ao da testemunha (Água). Os resultados das nanopartículas em tratamento curativo levantam a hipótese de um possível mecanismo sistêmico, mesmo que parcial, sendo que diferentemente do hidróxido de cobre, mesmo quando as bactérias já estavam parcialmente instaladas em ambiente intracelular, dois dias após a aplicação, as plantas referentes aos tratamentos com as nanopartículas SM Ag 0,1 e Cu 1 na concentração 5 mg.mL^{-1} apresentaram menores índices de severidade da doença.

Para nanopartículas de Ag e Cu em tratamento preventivo, as duas concentrações foram semelhantes, porém, no tratamento curativo, a mesma nanopartícula obteve desempenhos diferentes nas duas concentrações, onde a concentração 5 mg.mL^{-1} obteve melhores resultados.

Verifica-se através dos resultados que o manejo de uma cultura a campo tem grandes ganhos quando da aplicação de forma preventiva dos produtos fitossanitários, mas diferentemente dos experimentos científicos, onde ocorre monitoramento regular e mais rígido das variáveis, em populações menores e condições controladas, a campo talvez o monitoramento não seja tão assertivo e perca-se o time de aplicação. Desse modo a elaboração de produtos com efetivo controle de *Xanthomonas* spp. em condições de sistemicidade seria um avanço grandioso para as ciências agrárias.

Tabela 3. Área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana no tomateiro, no controle preventivo e curativo da doença com nanopartículas. Uberlândia – MG, 2019.

Produto	Controle	
	Preventivo	Curativo
SM: 0,1Ag [2.5]	18,0 bA	28,5 cB
SM: 0,1Ag [5,0]	24,0 bcA	22,5 bA
SM [2.5]	22,5 bA	30,0 cB
SM [5,0]	27,0 cA	30,0 cA
SM: 1Cu [2.5]	22,5 bA	28,5 cB
SM: 1Cu [5,0]	21,0 bA	24,0 bA
Hidróxido de Cobre	22,5 bA	27,0 bcB
Água	30dA	30cA
Testemunha	0aA	0aA
Média	21A	25B
CV (%)	12,1	

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5% de significância.

4. CONCLUSÃO

As nanopartículas de SM dopadas com 0,1Ag e 1Cu obtiveram melhores desempenhos que seu precursor SM puro, no controle de *Xanthomonas* spp. *in vitro* e promoveram também melhor controle que o tratamento comercial (hidróxido de cobre), nas concentrações de 5 mg.mL⁻¹ no tratamento curativo.

O tempo de exposição da bactéria às nanopartículas influenciam diretamente na redução de desenvolvimento das colônias, e o tempo de 5 horas de contato reduziu drasticamente a população bacteriana.

Não houve prejuízos para a germinação das sementes de tomate com a aplicação das nanopartículas de SM.

As nanopartículas de SM são promissoras formas de controle químico visando a redução da mancha bacteriana no tomateiro.

REFERÊNCIAS

- AHAMED, M.; ALHADLAQ, H. A.; KHAN, M. M.; KARUPPIAH, P.; ALDHABI, N. A. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. **Journal Nanomaterials**, v. 2014, p. 1-4, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/637858>. Disponível em <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2014/637858/>, acesso em 03/11/2019.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 89, p. 1175–1186, 2010.
<https://doi.org/10.1177/0022034510377794>. Disponível em <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034510377794>, acesso em 11/04/2019.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinic Microbiology**, v. 40, p. 2413-5, 1966.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes (RAS)**. Brasília: Mapa, 2009.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532 p.
- CARA, L. F. A.; COMPER, A. T.; RODRIGUES, E. B.; SKORONSKI, E.; FERNANDES, M.; NOGUEIRA, A. L.; KOSLOWSKI, L. A. D. **Uso de Nanopartículas de Prata suportada em Poliamida 66 na desinfecção de água para consumo humano**. Florianópolis: Banas qualidade, 2016.
- CARMO, M. G. F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L. A.; CARVALHO, A. O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 336-341, 1996.
- CURRENCE, T. M. Tomato breeding I. Species, origin and botanical characters. **Handbuch der pflanzenzuchtung**. v. 2, p. 351-369, 1963.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY. **Down to earth: Soil degradation and sustainable development in Europe**, A challenge for the 21st century. Copenhagen, 2010.
- ESPITIA, P. J. P. et al. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food Bioprocess Technology**. 5:1447-1464, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0797-6>. Disponível em <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11947-012-0797-6>, acesso em 18/01/2019.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.
- GRUMEZESCU, A. M. Applications of Nanobiomaterials. Oxford: Elsevier, 2016. v. 11.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 755-762, 2004. <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202005703179?via%3Dihub>, acesso em 13/04/2019.

JONES, A. **The European Environment State and Outlook**. Luxemburgo 2010.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G.; Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, and Xanthomonas. **Phytopathology**. 1970 Jun; v.60, n.6, p.969-976. <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5469886/>, acesso em 08/11/2019.

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. <https://doi.org/10.1021/es102624t>. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5469886/>, acesso em 25/09/2019.

MACEDO, J.A.B. **O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a portaria 518/2004 do Ministério da Saúde**. Congresso Brasileiro de Química. Fortaleza, 2004.

MACEDO, J. A. B. **O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a portaria 518/2004 do Ministério da Saúde**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004. Anais [...]. Fortaleza: [s. n.], 2004.

MAMEDE, M. C. **Detecção de Pantoea ananatis em sementes de milho e nanopartículas no controle da bactéria in vitro**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MARAMBIO, C. J.; HOEK, E. M. V.; A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 1531-155, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>. Disponível em <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-010-9900-y>, acesso em 10/03/2019.

MARCUZZO, L.L.; BECKER, W. F.; FERNANDES, J. M. C. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (Xanthomonas spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. **Summa phytopathologica**, Botucatu. v. 35, n. 2, p. 132-135, Jun. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200009>. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052009000200009&lng=pt&tln=pt, acesso em 05/05/2019.

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. <https://doi.org/10.1021/bm060721b>. Disponível em <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm060721b>, acesso em 11/10/2019.

MELLO, S. C. M.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 4, p. 447-448, 1997.

MENJOGE, A. R.; KANNAM, R. M.; TOMALIA, D. A. **Drug Discovery Today** 2010, v. 15, p. 171. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.01.009>. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644610000334?via%3Dihub>, acesso em 03/01/2019.

MOHR, L.C.; CAPELEZZO, T.; RIPPEL, R. Z.; TERNUS, F.; DALCANTON, M. A.; FIORI, J. M.; MELLO, M. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de ZnO e TiO₂ frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. **Revista CSBEA**, v. 3, n. 1. Chapecó, 2017. <https://doi.org/10.5965/24473650312017011>. Disponível em <https://www.revistas.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/8930>, acesso em 15/12/2019.

MOTA, R. P. da. **Agressividade, caracterização molecular de isolados de Pantoea ananatis e nanopartículas no controle da bactéria na cultura do milho**. 2019. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

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. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.074>. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389413006407?via%3Dihub>, acesso em 14/03/2019.

NASCIMENTO, A. R.; FERNANDES, P. M. F.; BORGES, L. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 15-24, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000100003>. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362013000100003&lng=pt&tlng=pt, acesso em 08/12/2019.

NASCIMENTO A. R; SOARES JÚNIOR M. S.; CALIARI M.; FERNANDES P. M.; RODRIGUES J. P. M.; CARVALHO W. T. Qualidade de tomates de mesa cultivados em sistema orgânico e convencional no estado de Goiás. **Horticultura Brasileira**. 2013 v. 31. p. 628-635. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000400020>. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362013000400020&lng=pt&tlng=pt, acesso em 04/06/2019.

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>. Disponível em <https://aem.asm.org/content/73/6/1712>, acesso em 06/11/2019.

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.
<https://doi.org/10.1021/jp063826h>. Disponível em
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp063826h>, acesso em 12/08/2019.

QUEZADO-SOARES, A.M.; LOPES, C. A. Controle químico da mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 25, n. 1, p. 21, jan./mar. 1999.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, Barretos, v. 5, p. 44-48, 2003. <https://doi.org/10.21800/S0009-67252013000300014>. Disponível em http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252013000300014&lng=pt&tlang=pt, acesso em 04/08/2012.

RODRIGUES, V. W. B.; BUENO, T. V.; TEBALDI, N. D. Biofertilizantes no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 1, p. 94-96, 28. Ago. 2015.
<https://doi.org/10.1590/0100-5405/2094>. Disponível em https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052016000100094&lng=pt&tlang=pt, acesso em 22/11/2018.

RUPARELIA, J. P. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**. v. 4. n.3. p. 707-16, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>. Disponivel em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S174270610700195X?via%3Dhub>, acesso em 11/10/2019.

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.

SOZER, N. KOKINI, J. L. Nanotechnoloogy and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>. Disponível em [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(08\)00291-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779908002916%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(08)00291-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779908002916%3Fshowall%3Dtrue), acesso em 20/02/2019.

TAVARES FILHO, S. **Simulação de estrutura e cálculo de propriedades de Zn₅(OH)₈Cl₂.H₂O e Zn₅(OH)₈(NO₃)₂.2H₂O** utilizando métodos ab initio. 2013. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

WARN, S. L.; KEEVIL, C. W. Optimization of the dosage of flucytosine in combination with amphotericin B for disseminated candidiasis: A pharmacodynamic rationale for reduced dosing. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82, n. 7, p. 2132-2136, 2016.

WANG, B.; YUYING, Z.; ZHENGWEI, M.; DAHAI, Y.; CHANGYIU, G. Toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages due to cell uptake and intracellular release of zinc ions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 14, n. 8, p. 5688-5696, 2014. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8876>. Disponível em <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2014/00000014/00000008/art00015;jsessionid=2nfetajdtg6fs.x-ic-live-02>, acesso em 22/04/2019.

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. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.