

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**EXTRATOS VEGETAIS E NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS COMO  
INIBIDORES DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis***

**ADRIELE SANTOS DA SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO – 2020**

**EXTRATOS VEGETAIS E NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS COMO  
INIBIDORES DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis***

**ADRIELE SANTOS DA SILVA**

Licenciada em Ciências Biológicas, Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia de Rondônia, 2016

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Harllen Sandro Alves Silva

Co-Orientador: Saulo Alves Santos de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO – 2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
ADRIELE SANTOS DA SILVA**

---

Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura/PPGMA  
(Presidente)

---

Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira  
Universidade Estadual de Feira de Santana

---

Dra. Maria Selma Alves Silva Diamantino  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola em  
\_\_\_\_\_.”

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e ao meu santo pelo amparo nos momentos de solidão, pela força e proteção diante dos desafios.

Aos meus pais Maria Helena e Abel pelo cuidado, amor, pela compreensão e apoio as minhas escolhas e ajuda nos momentos de necessidade.

Aos meus irmãos amados Adelvânio, Maria José, José, Alessandra, Adelson, Adielson, Andreia, Maria Sandriely e Rosa Gabriely por serem sempre presentes, por me ensinarem todo dia que a distancia dói, mas fortalece, fortalece o amor, a união. E claro obrigada por me presentear com sobrinhos incríveis.

Agradeço professor Harllen Sandro Alves Silva pela orientação, pelos ensinamentos, cobranças, por me acalmar nos momentos de agonia e ajudar a encontrar as soluções nos momentos de adversidade.

Agradeço ao professor e co-orientador Saulo Alves Santos de Oliveira, pelas orientações e esclarecimentos e direcionamentos sobre o projeto, pela importante colaboração na montagem dos ensaios e análise de dados.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, por propiciar a minha entrada no curso e pela experiência mais desafiadora já vivida.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura por fornece a estrutura e materiais necessários para realização desse projeto. Incluo aqui todos aqueles que contribuiu com esse projeto de alguma forma. Em especial o pessoal do Laboratório de Microbiologia do Solo, equipe técnica Luciano pelos conhecimentos transmitidos e ajuda no planejamento e montagem dos ensaios.

Aos meus amigos de Rondônia em especial Cláudia, Renata e Jhones. Obrigada por estarem sempre presentes, pelo carinho e apoio mesmo a distancia.

Aos meus amigos da Bahia Lorena, Raoni, Fernando, Maria Cristiane por proporcionarem momentos de descontração e risos, pelas conversas de apoio quando os experimentos não saiam como esperado.

A Jeferson pela companhia, carinho, amor e cuidado. Obrigado por passar comigo e ser meu amparo nos momentos mais tensos.

A Samantha e Ingrid com quem divide casa nesse período, obrigada pela acolhida.

Obrigada Seu Jorge do citrus pela ajuda para carregar plantas e pelas palavras encorajadoras.

Agradeço aos estagiários Jorge e Diego pelo apoio e conversas animadas durante o trabalho.

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1 A MANDIOCA E SEU CULTIVO .....	15
3.2 APLICAÇÕES DA MANDIOCA E FATORES QUE CONTRIBUEM PARA A REDUÇÃO DA PRODUTIVIDADE .....	16
3.3 BACTERIOSE DA MANDIOCA .....	18
3.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	20
3.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE E APLICABILIDADE COMERCIAL DESSES METAIS .....	22
3.6 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR PLANTAS .....	24
3.7 EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS E PARA A AGRICULTURA.....	26
3.8 APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS E PARA A AGRICULTURA.....	28
REFERÊNCIAS .....	31
<b>4 CAPÍTULO II: “Aplicação de nanopartículas de cobre e prata biossintetizadas para o controle de <i>xanthomas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>”</b> .....	40
<b>5 INTRODUÇÃO</b> .....	44
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E CARACTERIZAÇÃO.....	46
<b>6.1.1 Caracterização por espectrofotometria UV-vis e Potencial Zeta</b> .....	47
6.2 SENSIBILIDADE DE <i>XANTHOMONAS</i> AOS ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO.....	47
6.3 DETERMINAÇÃO DOS MELHORES TRATAMENTOS .....	48
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
7.1 ANÁLISE DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E POTENCIAL ZETA. ....	49
<b>7.1.1 Espectroscopia UV-vis com sal de prata</b> .....	50

<b>7.1.2 Espectroscopia UV-vis com sal de cobre</b> .....	52
7.2 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	54
7.3 MELHORES TRATAMENTOS ORIGINAIS X ESTIMADOS .....	58
<b>7.3.1 UV-vis do ensaio de originais versus estimados</b> .....	60
7.4 DISCUSSÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	61
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
<b>ANEXOS</b> .....	76

SILVA, A. S. **EXTRATOS VEGETAIS E NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS COMO INIBIDORES DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*** Cruz das Almas, 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

**RESUMO:** A mandioca é uma das mais importantes fontes de alimento para bilhões de pessoas, essencialmente nos países em desenvolvimento. A produção de mandioca sofre quedas em decorrência de diversos fatores e o ataque por patógenos causam grandes prejuízos. Dentre as principais doenças da mandiocultura, a bacteriose causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) se destaca como uma das mais importantes. As formas de controle mais eficazes estão relacionadas com medidas preventivas, no entanto essas medidas não garantem seguridade da cultura. Desse modo, a busca por alternativas ao controle dessa doença e as associações de nanopartículas metálicas de prata (AgNPs), cobre (CuNPs) e extratos vegetais são promissores. Visto isso o objetivo desse projeto consta em controlar a bacteriose da mandioca com nanopartículas biossintetizadas a partir de extratos vegetais. Foram preparados extratos de 20 plantas diferentes combinados com os sais de sulfato de cobre e nitrato de prata. A partir dessas soluções foram montados os antibiogramas para avaliação de quais extratos e nanopartículas exerceram maior efeito antimicrobiano sobre as colônias de Xpm. Os tratamentos também foram submetidos à caracterização por espectroscopia Uv-vis e potencial zeta. De acordo essas análises as combinações com prata indicam a formação das nanopartículas, já para as combinações com cobre não é observado a biossíntese de NPMs. Foram testados 846 tratamentos, considerando como base o controle de estreptomicina a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  que atingiu uma média de inibição de 11,08. Obteve-se 80 combinações melhores que a testemunha. Todos associadas ao Cu 100 e 50mM com variados extratos e concentrações. O tratamento de cobre com melhor desempenho foi o de coentro a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  associado ao cobre 100 mM, com inibição média de 60,63. Dos tratamentos a base de prata o mais eficaz foi o de extrato de boldo a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  associado a prata a 10 mM, a média de inibição atingida por esse tratamento foi de 10,43. Dos tratamentos composto somente pelo extrato aquoso bruto, apenas o extrato de aroeira apresentou algum potencial de inibir o crescimento de Xpm.

**Palavras chave:** Síntese verde, controle químico, bacteriose.

SILVA, A. S. **EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS E NANOPARTÍCULAS BIOSSINTETIZADAS CONTRA *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*** Cruz das Almas, 2020. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

**ABSTRACT:** Cassava is one of the most important sources of food for billions of people, mainly in developing countries. Cassava production declines as a result of several factors and the attack by pathogens causes great losses. Among the main diseases of mandioculture, bacteriosis caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) stands out as one of the most important. The most effective forms of control are related to preventive measures, however these measures do not guarantee crop safety. Thus, the search for alternatives to control this disease and the associations of metallic silver nanoparticles (AgNPs), copper (CuNPs) and plant extracts are promising. In view of this, the objective of this project is to control cassava bacteriosis with nanoparticles that are biosynthesized from plant extracts. Extracts from 20 different plants were prepared combined with the copper sulfate and silver nitrate salts. From these solutions, antibiograms were assembled to assess which extracts and nanoparticles had the greatest antimicrobial effect on the Xpm colonies. The treatments were also subjected to characterization by UV-vis spectroscopy and zeta potential. According to these analyzes, combinations with silver indicate the formation of nanoparticles, whereas for combinations with copper, the biosynthesis of NPMs is not observed. 846 treatments were tested, considering the control of streptomycin at  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , which reached inhibition of 11.08. 80 better combinations were obtained than the control. All associated with Cu 100 and 50mM with varied extracts and concentrations. The copper treatment with the best performance was coriander at  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  associated with 100 mM copper, with 60.63 inhibition average. Of the silver-based treatments, the most effective was boldo extract at  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  associated with 10 mM silver, the inhibition average achieved by this treatment was 10.43. Of the treatments composed only of the crude aqueous extract, only the extract of aroeira showed some potential to inhibit the growth of Xpm.

**Keywords:** Green synthesis, chemical control, bacteriosis.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) se configura como uma das mais importantes fontes de carboidrato para bilhões de pessoas, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (IULIANELLI E TAVARES, 2011; FERREIRA FILHO et al., 2013; CHETTY et al., 2013).

O cultivo da mandioca é comum em todo território brasileiro, sendo umas das culturas de maior representatividade socioeconômica, visto que é conduzido principalmente por agricultores familiares, os quais tem nessa atividade sua principal fonte de renda (FERREIRA FILHO et al., 2013).

De acordo com levantamento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil é o quinto maior produtor mundial de raiz de mandioca com uma produção de 18,87 milhões de toneladas (FAO 2017). Mesmo com elevada área cultivada em diversos países do mundo, essa cultura é acometida por problemas que contribuem para a redução da produção.

A cultura da mandioca é afetada por diversos patógenos, que induzem podridões internas ou externas e invadem os tecidos lenhosos do caule. Dentre as doenças que acometem a cultura, são consideradas como de alta relevância: a podridão radicular, a bacteriose da mandioca, o superalongamento, viroses em geral, dentre outras (SILVA e ANDRADE, 2011; FERREIRA FILHO et al., 2013). Essas doenças, além de causarem significativa redução na produtividade de raízes, também afetam negativamente o rendimento de manivas, visto que atingem o caule da planta (OLIVEIRA et al., 2013).

A bacteriose causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) (sin = *X. axonopodis* pv. *manihotis*) é uma enfermidade importante, endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Em condições climáticas favoráveis, essa bactéria pode ocasionar a perda de até 100 % do cultivo quando manifestada em variedades suscetíveis (SILVA e ANDRADE, 2011), afetando severamente a produção de mandioca em todo o mundo (MANSFIELD et al., 2012).

As formas mais eficazes de controle dessa doença estão relacionadas com medidas preventivas, como evitar plantios e aquisição de materiais de áreas infestadas, empregar variedades mais tolerantes (SILVA e ANDRADE, 2011; FERREIRA FILHO et al., 2013). Outra medida adotada para o controle da bacteriose é a utilização de compostos cúpricos (SUNDIN et al., 2016).

A busca por variedades resistentes e outros métodos de controle tem sido

uma constante no tocante às pesquisas voltadas a doenças de plantas. No entanto, não se dispõe de uma cultivar que seja totalmente resistente à bacteriose (MASSOLA e BEDENDO, 2005). Não obstante, as medidas preventivas não são totalmente efetivas, ficando evidente a necessidade de buscar novas tecnologias para o controle dessa doença.

Como uma estratégia de controle a ser aplicada para o manejo da bacteriose da mandioca, vem se intensificando os estudos relacionados à utilização de nanopartículas metálicas (NPMs) como agente antibacteriano (SUNDIN et al., 2016).

A nanotecnologia em processos biológicos tem aplicações no meio agrícola, na medicina, cosméticos e eletrônica (RAI, 2013; SILVA, 2017), em que combina princípios biológicos com abordagens físicas e químicas para produzir nanopartículas com funções específicas. Elementos como a prata, alumínio, ouro, zinco, ferro e cobre e outros são comumente usados para a síntese de nanopartículas (SILVA et al., 2017).

A nanociência permeia vários campos com inovações tecnológicas e o setor agrícola não é exceção. Por muito tempo o uso da nanociência na agricultura foi predominantemente teórico, mas esse quadro está mudando, e há a tendência em se prosseguir os estudos relacionados ao emprego da nanociência no manejo das principais doenças de plantas (SAHAYARAJ e RAJESH, 2011).

As NPMs de prata compreendem uma alternativa com alto potencial para utilização contra fitopatógenos. Nanopartículas sintetizadas por sistemas biológicos, também conhecidos como síntese verde ou biossíntese, são minimamente agressivas ao ambiente e aos seres que nele habitam e várias espécies vegetais apresentam-se como potenciais para a sua biossíntese (SILVA et al., 2017; IRAVANI, 2011). Na agricultura, o uso de nanopartículas para o controle de fitopatógenos representa uma importante inovação tecnológica que proporcionará melhorias na produtividade (FURLANETO, 2011). Dessa forma estudos que investigue espécies vegetais que possam apresentar capacidade para a biossíntese de nanopartículas metálicas (NPMs), para o emprego no controle do patógeno *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* incidente nas culturas de mandioca no país é de significativa relevância.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Controle da bacteriose da mandioca pela aplicação de nanopartículas biossintetizadas a partir de extratos vegetais.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial antimicrobiano de extratos vegetais e possível aplicabilidade no controle da bacteriose da mandioca;
- Obter e otimizar o processo de biossíntese nanopartículas de prata e cobre a partir de extratos vegetais;
- Identificar as melhores combinações de “extratos vegetais × sal metálico” para obtenção de nanopartículas;
- 
- Verificar a inibição do crescimento de *Xanthomonas phaseoli* pv. *mahihotis* *in vitro* pela aplicação de nanopartículas biossintetizadas.

### **3. CAPÍTULO I**

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### 3.1. A MANDIOCA E SEU CULTIVO

De acordo com a classificação botânica, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta dicotiledônea pertencente à família Euphorbiaceae (AFONSO, 2013), caracterizada como uma planta heliófila, perene e arbustiva, originária do continente americano. Quando houve a colonização do Brasil pelos portugueses a mandioca já era cultivada pelos habitantes locais. É provavelmente a planta cultivada mais disseminada no território brasileiro. Embora o local exato de origem dessa espécie ainda seja controverso, o Brasil é provavelmente o país onde se observa a maior variação nas formas de utilização da planta e suas raízes (SANTOS, 2010).

A mandioca é uma planta altamente tolerante à seca, tendo bom desenvolvimento em solos com baixa fertilidade, onde as raízes são o principal produto do cultivo (VALLE e LORENZI, 2014). Essas raízes, em sua composição, apresentam uma significativa quantidade de amido, que representa uma das mais importantes fontes de carboidrato. Além disso podem conter, em menor, parcela proteínas, lipídios e minerais como potássio, cálcio, fósforo, sódio e ferro, nutrientes essenciais para na alimentação de bilhões de pessoas, essencialmente nos países tropicais e em desenvolvimento como no Brasil (IULIANELLI E TAVARES, 2011; FERREIRA FILHO et al., 2013; CHETTY et al., 2013).

De acordo com o levantamento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de raiz de mandioca correspondeu a 291,993 milhões de toneladas no ano de 2017, com o Brasil na quinta posição com uma produção de 18,87 milhões de toneladas, atrás somente da Nigéria, República Democrática do Congo, Tailândia e Indonésia. Outros países classificados como grandes produtores mundiais são Gana e Angola (FAO 2017).

A mandioca é comum em todo território brasileiro, sendo umas das culturas de maior representatividade socioeconômica, visto que seu cultivo se dá principalmente por agricultores familiares, que tem nessa atividade sua principal fonte de renda (SOUZA, SILVA e SILVA, 2012; FERREIRA FILHO et al., 2013).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de raízes de mandioca atingiu 20,8 milhões de toneladas no ano de 2018, com uma área cultivada colhida de 1,4 milhões de hectares. Em 2019, a estimativa é de que a safra seja 1,6 % inferior, sendo estimada em 20,5 milhões de toneladas devido à redução da área plantada observada na maioria dos estados brasileiros.

Também, pelos produtores estarem migrando para culturas mais rentáveis ou deixando de colher por aguardarem melhores nos preços (CONAB, 2019).

O Pará é o estado com a maior produção de raiz de mandioca do Brasil seguido por Paraná e Bahia, com safras de 4,23, 3,04 e 2,07 milhões de toneladas em 2017, respectivamente (EMBRAPA, 2018).

O Brasil além de apresentar o cultivo da mandioca amplamente difundido pelo país, para consumo da população local, também exporta parte do que é produzido. No início de 2019 a balança comercial da exportação de raízes apresentou expectativas positivas em relação ao mesmo período em 2018. No mercado internacional o principal comprador de raízes de mandioca em 2019 foram os Estados Unidos, com 85,51 % do volume exportado, Uruguai com 3,87 %, Argentina 2,98 %, Reino Unido 1,64 % e Cingapura, com 1,63 %. Nesse período 15,1 toneladas de raízes foram exportadas, gerando uma receita de US\$ 35,5 mil para o país (CONAB, 2019).

Além das raízes o Brasil também exporta fécula de mandioca. Entre os principais compradores estão os Estados Unidos, Bolívia, Espanha seguido por Portugal e Itália. Esses países são responsáveis pela importação de aproximadamente 98,70 % de fécula. Até setembro de 2019 a exportação de fécula gerou uma receita em torno de US\$ 3,66 milhões (CONAB, 2019).

### 3.2. APLICAÇÕES DA MANDIOCA E FATORES QUE CONTRIBUEM PARA A REDUÇÃO DA PRODUTIVIDADE

Existe um grande número variedades disponíveis de mandioca que são classificadas quanto ao seu potencial tóxico em doces, mansas ou de “mesa”, também conhecidas como aipim ou macaxeiras, com baixos teores de ácido cianídrico. Normalmente são empregadas no consumo humano, após o cozimento, e animal *in natura* ou processada. Amargas ou bravas, com maiores teores de ácido cianídrico. Usadas indiretamente na alimentação humana, após processamento nas indústrias de farinha e de fécula (SANTOS 2010; IULIANELLI e TAVARES, 2011).

Para alimentação humana a mandioca é comumente utilizada na forma de farinhas cruas ou torradas, produzidas em diferentes regiões do Brasil, fazendo parte do hábito alimentar do brasileiro. Dentre outras aplicações na alimentação destacam-se algumas formas de consumo desse produto: mandioca pré-cozida congelada pronta para fritar; polvilho doce ou azedo usado na fabricação do pão de

queijo, beijus, farofas prontas; aditivo na fabricação de embutidos como balas, bolachas, sobremesas, sagu, sopas, bolos, pão; maniçoba a partir das folhas, e até mesmo a água obtida na prensagem da massa no processo de produção da farinha é aproveitada. Denominada de manipueira, essa água é utilizada na obtenção do tucupi, ingrediente importante para a culinária da região Norte, como no preparo do pato no tucupi (SEBRAE BAHIA 2009, FERREIRA FILHO et al., 2013, SANTOS, 2010).

A mandioca também possui aplicações no setor industrial. O amido pode ser utilizado na mineração atuando na separação do minério de ferro, e extração de petróleo, evitando o desgaste de brocas de perfuração de poços. Pode ser empregado também na indústria farmacêutica, de papel e celulose, para dar corpo, acabamento e goma (FERREIRA FILHO et al., 2013; SANTOS, 2010). As variedades de mandioca doces, que armazenam açúcares livres nas raízes, podem ter aplicação na produção de álcool para as indústrias de cosméticos e combustíveis (VIEIRA et al., 2011); e têxtil, para engomagem, estamperia, acabamento e lavanderia, detergentes biodegradáveis plásticos biodegradáveis (OTSUBO e PEZARICO, 2002).

A mandioca também é empregada na alimentação animal. Para essa finalidade são utilizadas as raízes, folhas e ramos. As raízes são fornecidas integralmente, ou somente as cascas que sobram da raspagem para fazer farinha. Antes de serem fornecidas aos animais devem ser picadas e colocadas para secar à sombra, durante um ou dois dias, após secagem é chamado raspa de raiz de mandioca ou feno da parte aérea da mandioca, em caso de conhecimento da variedade a ser utilizada esse procedimento pode ser dispensado oferecendo o alimento diretamente aos animais (FERREIRA FILHO et al., 2013, SANTOS, 2010).

Como visto a mandioca é um alimento muito versátil tanto pra aplicação industrial quanto na agricultura de subsistência. Por isso se configura como um dos alimentos mais importantes em diversos países em desenvolvimento.

E não diferente de outras culturas, o cultivo da mandioca possui diversos fatores que limitam sua produtividade. A queda da produtividade da mandiocultura pode acontecer em decorrência de diversos fatores, como a competição com plantas infestantes por água, luz, nutrientes do solo. Outro fator limitante ao cultivo de mandioca é a presença de ácaros e insetos, mandarová, mosca do broto, percevejo, cupins, formigas, dentre outros, que ao atacarem a cultura provocam a redução da

produção e qualidade das raízes, bem como compromete os materiais de propagação (FERREIRA FILHO et al., 2013).

Outro fator limitante ao cultivo da mandioca são os diversos patógenos que induzem podridões internas ou externas, cancrios que invadem os tecidos lenhosos do caule. Dentre as doenças que acometem a cultura da mandioca, são consideradas como mais importantes: podridão radicular, a bacteriose, antracnose, superalongamento, super brotamento e viroses, responsáveis por grandes prejuízos econômicos. A forma mais eficaz de controle dessas doenças esta relacionada com medidas preventivas, como evitar plantios e aquisição de materiais provenientes de áreas afetadas, buscar variedades mais tolerantes, praticar a rotação de cultura, fazer o manejo físico e químico do solo e fazer o plantio na época adequada sempre com material propagativo de qualidade e livre de doenças (SILVA e ANDRADE, 2011, FERREIRA FILHO et al., 2013).

### 3.3. BACTERIOSE DA MANDIOCA

A bacteriose da mandioca é causada pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) (CONSTANTIN et al., 2016; RACHE et al., 2019). Todas as espécies que pertencem a esse gênero são patógenos de plantas, encontradas somente em associação com material vegetal ou plantas (AGRIOS, 2005).

Essa bactéria é classificada como gram-negativa, com parede celular delgada, tem formato de bastonete, aeróbica estrita, com um único flagelo polar (monotriquia), e diferente de outras espécies do gênero *Xanthomonas* a Xpm não produz o pigmento amarelo xantomonadina (FANOU, ZINSOU e WYDRA, 2018). É um patógeno foliar e vascular, que ocasiona uma ampla expressão de sintomas por parte da planta durante o processo de infecção (LÓPEZ, RESTREPO e VERDIER, 2006; AQUILES, 2014).

A penetração do patógeno na planta hospedeira ocorre pelos estômatos foliares ou via ferimentos causados por vento, trânsito de pessoas e animais, e a utilização de ferramentas e equipamentos contaminados (ANJOS et al., 2011; MANSFIELD, 2012).

Alguns dos sintomas mais característicos da doença quando as plantas de mandioca são atacadas por Xpm, de início, são lesões encharcadas angulares. A partir daí as manchas desenvolvem-se inicialmente ao longo das nervuras, margem e ponta das folhas. À medida que a doença avança as manchas podem coalescer e

tomar todo o tecido foliar, que adquire uma coloração marrom. Depois que a infecção já está estabelecida, a bactéria migra para o xilema e os sintomas evoluem para exsudação de goma nas hastes com murcha das folhas e pecíolos, necrose do sistema vascular e morte descendente da planta (MOSES et al., 2007; SILVA e ANDRADE, 2011; OLIVEIRA et al., 2016).

Essa doença foi reportada primeiramente no Brasil em 1912 por Bondar no estado de São Paulo. A partir da década de 1940, e principalmente no decorrer da década de 1970, essa doença se disseminou pelas regiões de cultivo da mandioca na América do Sul e Central, pelo Caribe, Ásia e África. Com os surtos epidêmicos nessas regiões surgiram os primeiros escritos relatando a ocorrência dessa doença, e atenções maiores foram sendo voltadas para essa patologia devido à importância da mandioca como alimento de subsistência (BRADBURY, 1986; KIMATI et al., 2005).

Entre as diversas doenças que ocorrem na mandioca a bacteriose figura entre as principais, e no Brasil ocasiona maiores perdas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Os prejuízos causados pela bacteriose variam principalmente de acordo com as condições climáticas, suscetibilidade ou tolerância das variedades, práticas culturais utilizadas, épocas de plantio e nível de contaminação do material (SOUZA E FIALHO, 2003; TREMACOLDI, 2016).

Para o caso da bacteriose o regime de chuvas e a temperatura é um fator limitante para seu desenvolvimento. Exemplo disso, na região norte a incidência dessa doença ocorre em baixa intensidade, pois mesmo havendo alto índice pluviométrico o clima apresenta temperaturas mais elevadas (SILVA e ANDRADE, 2011). Essa bactéria apresenta desenvolvimento ótimo em temperaturas entre 25 e 30 °C (FANOU, ZINSOU e WYDRA, 2018). Em cultivos com variedades suscetíveis as perdas na produção podem chegar a 30 %, e em condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença os prejuízos podem ser totais (SOUZA e FIALHO, 2003; MOSES et al., 2007).

A principal forma de disseminação dessa bactéria, a longa distância, se dá pela utilização de material de propagação contaminado, principalmente em novas áreas de plantio (MASSOLA e BEDENDO, 2005; ANJOS et al., 2011). As barreiras sanitárias não conseguem evitar a entrada de materiais de propagação com problemas fitossanitários, sendo que muitas cultivares foram introduzidas em outros estados sem uma prévia avaliação (FONSECA et al., 2002).

Já dentro dos campos de cultivo a principal forma de disseminação da bactéria é por meio da chuva, pelos respingos, que permitem a liberação das células bacterianas presentes nas exsudações. Esse fator pode ser verificado durante o período da estação chuvosa, onde há um aumento da severidade da manifestação dessa doença nas áreas de plantio contaminadas. Esse aumento na manifestação da doença pode ser notado principalmente nas primeiras chuvas após o período seco, atingindo seu máximo no pico da estação chuvosa (HILLOCKS e WYDRA, 2002; MASSOLA e BEDENDO, 2005;).

Para o controle da bacteriose da mandioca são recomendadas algumas medidas preventivas, a fim de controlar a propagação do patógeno. Dentro desses controles MASSOLA e BEDENDO (2005) e MOSES et al., (2007) destacam algumas medidas de prevenção tais como: utilização de manivas sadias; rotação de culturas ou remoção dos restos culturais, seguida de aração e pousio por seis meses, isso deve ser feito visando a quebra do ciclo de vida do patógeno; restrição do movimento de pessoas dentro das áreas afetadas para áreas que não possui o patógeno; realizar a inspeção fitossanitária com a erradicação das plantas doentes; utilizar uma cultura intercalar, a fim de reduzir a disseminação da bactéria entre as plantas; fazer o plantio no final do período chuvoso, permitindo uma maior lignificação dos vasos no período da seca, dificultando a colonização da bactéria.

Visto que somente medidas preventivas não são suficientes para o estabelecimento de controle de fitopatógenos, lança-se mão de uma ampla gama de compostos agroquímicos que estão disponíveis no mercado que exercem mecanismos de controle sobre o patógeno. E como estratégia de controle a ser aplicada para o manejo da bacteriose da mandioca, vem se intensificando as pesquisas utilizando as NPMs como agentes antibacterianos (SUNDIN et al., 2016). Principalmente com base no princípio da nanotecnologia verde, que utiliza um organismo biológico ou parte dele para fazer a biossíntese das NPMs (MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013).

#### 3.4. SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A síntese verde é a denominação atribuída às rotas de síntese que utilizam produtos químicos que apresentam baixa toxicidade, baixo custo e são biodegradáveis, para sintetizar materiais nanoestruturados, como as nanopartículas.

São consideradas nanopartículas por apresentarem o tamanho em nanoescala, geralmente de 1 nm a 100 nm (SILVA et al., 2016).

Em geral as nanopartículas são sintetizadas por meio de métodos químicos, físicos e biológicos. As sínteses físicas e químicas possuem consumo intensivo de energia, bem como podem envolver substâncias químicas tóxicas que geram resíduos prejudiciais, tanto a saúde quanto ao ambiente. Já as técnicas biológicas são, atóxicas e mais ecológicas (SILVA et al., 2017).

Para classificar um mecanismo como síntese verde de NPMs devem ser utilizados como fonte primária organismos biológicos ou partes deles, como tecidos, biomoléculas, metabólitos, órgãos ou células de plantas, algas, fungos, bactérias, resíduos agroindústrias como penas, sangue e escamas (MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013; SILVA et al, 2016).

Esses recursos naturais possuem um elevado potencial para utilização durante a síntese verde de NPMs, por intermédio de processos de oxirredução em meio aquoso (FARAMARZI e SADIGHI, 2013). Esse processo de redução pode ocorrer no meio intra ou extracelular, e nesse caso os componentes presentes nesses organismos, como as biomoléculas e os compostos secundários, são os responsáveis pela redução dos compostos que formará as NPMs (SINHA et al., 2009).

Plantas como o coentro (*Coriandrum sativum*), mamão-papaya (*Carica papaya*), têm sido usadas para a síntese de nanopartículas. O método de fitossíntese (síntese via plantas) é rápido e rentável, com processamento mais eficiente que a síntese por fungos (micossíntese). Quando comparada à fitossíntese, a micossíntese é mais demorada e a biomassa é difícil de ser processada. Logo, a fitossíntese atrai a atenção de pesquisadores de todo o mundo. São três os fatores considerados chaves na síntese de nanopartículas metálicas: agente redutor, meio de reação e agente estabilizador (DURÁN et al., 2005).

Na biossíntese, proteínas de fungos ou plantas agem como agentes de proteção e estabilização das nanopartículas sintetizadas. Síntese verde a partir de extrato de plantas é a técnica mais simples de sintetizar nanopartículas, em que biomoléculas funcionais que reduzem íons metálicos são produzidas (GADE et al., 2010; RAI, 2013). A biomassa morta e seca da planta também pode ser usada para

a síntese de nanopartículas. Até mesmo compostos bioativos isolados de plantas como alcaloides, flavonoides e terpenos (SILVA et al., 2017).

Nanotecnologia verde é uma abordagem que esta em sintonia com a busca por meios mais sustentáveis de produção em que utilizam métodos e materiais que visam à geração de produtos com menor impacto ambiental (NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2011). Essa tecnologia apresenta a característica de ser menos agressivo ao ambiente por permitir ser aplicado diretamente no organismo ou função de interesse. É um processo mais simplificado para ocorrer a redução e também podem ser degradados por rotas biológicas; essas características conferem a essa técnica a possibilidade de reduzir os custos de produção e obter um rendimento mais elevado (SHARMA, YNGARD e LIN, 2009; THAKKAR, MHATRE e PARIKH, 2010).

Esta tecnologia ainda está em seu início, abrindo possibilidades para a elaboração de novas aplicações mais ecológica e viável quando relacionada à economia, que são necessidades contemporâneas de uma sociedade que visa buscar hábitos para um desenvolvimento mais sustentável (RAI, 2013).

### 3.5. NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COBRE E APLICABILIDADE COMERCIAL DESSES METAIS

As nanopartículas de prata ganharam atenção devido à sua atividade antimicrobiana, que oferece a possibilidade de sua utilização para fins médicos e de higiene. As nanopartículas de prata em diferentes formulações e com diferentes formas e tamanhos exibem atividade antimicrobiana variável (DURÁN et al., 2010).

Parte do fascínio que envolve o assunto é atribuído às inúmeras aplicações das nanopartículas metálicas, como construção de sensores, microeletrônica, catálise, ação bactericida, células fotovoltaicas, entre outras (MELO JR. et al., 2012). As nanopartículas com dimensão dentro da faixa de 1-100 nm possuem propriedades físicas e químicas únicas, incluindo grande relação superfície / massa, alta reatividade e interações únicas com sistemas biológicos (ZHANG et al., 2008).

As nanopartículas de prata têm sido muito utilizadas como antimicrobianos na desinfecção de materiais hospitalares, antissépticos para prevenção da infecção hospitalar, como bacteriostáticos em desodorantes, em materiais dentários, próteses internas e cateteres intravenosos, condutores e aditivos

alimentares. Sua ampla atividade bactericida e custo relativamente baixo na fabricação as tornaram extremamente populares. As nanopartículas de sais de prata possuem diversas aplicações, mas dentre elas destaca-se o seu potencial antimicrobiano (MATHIAS, ROMANO e ROMANO, 2014). O mecanismo exato pelo qual ocorre essa atividade ainda não está totalmente elucidado, mas é provável que ocorra por uma ligação com a membrana bacteriana e que consequentemente interfira no metabolismo bacteriano (KIM et al., 2007).

Na utilização das nanopartículas de cobre existe um grande interesse na confecção de elétrodos modificados, capazes de oxidar hidrazina. Hidrazina é a diamina mais simples, composto-base para vários derivados que podem ser usados em soluções combustíveis, inibidores de corrosão, catalisadores, pesticidas, corantes e fármacos (MARK et al., 2005; TKACHA et al., 2014).

O cobre é amplamente utilizado para confecção de fios elétricos, para aumentar a eficiência dessa condutibilidade elétrica. Além de ser excelente condutor elétrico o cobre apresenta boa condutividade térmica, e elevam a resistência mecânica (GROZA e GIBELING, 1993; SINGH, 2014).

O cobre também foi amplamente empregado como agente antimicrobiano, na preparação de medicamentos para tratamentos de variadas doenças como: tuberculose, sífilis, anemia dentre outras, sua utilização para esse fim se deu principalmente entre os séculos 19 e 20 até o período do advento dos antibióticos. No entanto, ao longo dos anos pela pressão de seleção sobre as bactérias permitiram que uma resistência a esses antibióticos fosse desenvolvida, com isso tem-se novamente atribuído à importância dos produtos à base de cobre como antimicrobianos. Há interesse no uso do cobre como material de auto-higienização, seus efeitos já foram avaliados na utilização em maçanetas, para impedir a disseminação de microrganismos em hospitais, e verificaram que nesses objetos o desenvolvimento microbiano permaneceu despercebido. Baseado nesse mesmo princípio, a ideia de usar vasos de cobre para tornar a água potável foi revivida recentemente, como uma alternativa de baixo custo para os países em desenvolvimento (GRASS, RENSING e SOLIOZ, 2011).

No manejo de doenças de plantas o tamanho da partícula desempenha um papel central na atividade antimicrobiana. Nanopartículas de prata e cobre, com tamanhos variáveis exercem diferentes níveis de atividade antimicrobiana. Pequenas partículas exibem maior atividade antimicrobiana do que partículas

grandes, isso pode ser em decorrência de alta penetração de partículas quando estas têm tamanhos menores (DURÁN et al., 2010). A avaliação das nanopartículas para o gerenciamento de doenças das plantas até o momento se concentrou principalmente em doenças causadas por oomicetos e fungos, mas também foram obtidos resultados promissores para doenças bacterianas (SUNDIN et al., 2016).

As atividades antimicrobianas da maioria das nanopartículas resultam de três aspectos principais: fotocatalise, dano físico as células bacterianas e liberação de íons metálicos tóxicos. Durante a fotocatalise são liberadas as espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas ROS são tóxicas para as bactérias, pois podem danificar os constituintes celulares, como DNA, lipídios e proteínas, resultando em efeitos bactericidas (STORZ e IMLAY, 1999).

Utilizando nanopartículas de prata (Ag) e zinco (Zn) Paret et al., (2013), verificaram um aumento significativo da atividade fotocatalítica contra *Xanthomonas perforans* em plantas de tomate, reduzindo a severidade da mancha bacteriana, quando comparado com os controles tratados com cobre e os não tratados.

As nanopartículas podem exercer atividade antimicrobiana por meio da liberação de íons, como  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , que são tóxicos para bactérias.

Além das atividades antimicrobianas, também foram sugeridas como sistemas de entrega vários ingredientes ativos que intensificam a ação de pesticidas. A aplicação de nanopartículas na agricultura poderia ampliar significativamente a seleção de antimicrobianos. Além disso, a maioria exibem atividades antimicrobianas por diferentes mecanismos, o que poderá reduzir o risco de desenvolvimento da resistência. A aplicação de nanopartículas abre novas oportunidades para aumentar a eficácia dos antimicrobianos atualmente disponíveis visando patógenos dentro das plantas (SUNDIN et al., 2016).

### 3.6. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POR PLANTAS

A biossíntese de NPMs por intermédio das plantas é uma prática crescente no meio científico. Tal fato ganha por força devido ao elevado potencial de diversas plantas em promoverem a formação das NPMs (IRAVANI, 2011; BAKER et al., 2013; INGALE, 2013; MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013).

Esse elevado potencial das plantas em promoverem a redução dos íons metálicos se deve a sua ampla gama de componentes (MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013). Dentre esses compostos são reportados os flavonoides, terpenoides, grupos funcionais tais como os álcoois, aldeídos e aminas, aminoácidos, proteínas de membrana, algumas enzimas, saponinas, polissacarídeos entre outros componentes (AKHTAR et al., 2013). Essas moléculas fazem das plantas uma fonte promissora para o fornecimento de moléculas para rotas de síntese verde (SINHA et al., 2009; KUMARI, KUMAR e YADAV, 2012).

Esses compostos além da função de redução podem desempenhar o papel de agentes estabilizantes de NPMs, por meio do recobrimento da superfície da partícula, com isso o crescimento é limitado e dificulta também a agregação da partícula (INGALE, 2013). É sabido que essa diversidade de composto são os responsáveis pela formação e estabilização das NPMs, no entanto o mecanismo exato de como ocorre à síntese por intermédio das plantas ainda não é totalmente elucidado (DURAN et al., 2011; NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2011; AKHTAR et al., 2013).

Quando se trata de plantas como organismo biológico que vai atuar na redução dos sais metálicos deve-se considerar que diferentes partes vegetais podem produzir partículas com características distintas. Normalmente se utiliza das folhas para obter os extratos, no entanto é sabido que não somente as folhas possuem capacidade redutora, sendo desenvolvido estudos com sementes (LUKMAN et al., 2011; VIJAYARAGHAVAN et al., 2012), cascas (SATHISHKUMAR et al., 2009, SHAMELI et al., 2012; VELAYUTHAM et al., 2013), raízes (GNANADESIGAN et al., 2012) e até mesmo frutos (QUELEMES et al., 2013) e flores (MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013).

Há na natureza um número significativo de plantas das mais variadas espécies que podem atuar na síntese de NPMs. Na literatura científica existem estudos que reportam o potencial redutor de íons metálicos por atuação de extratos de diversas plantas. Alguns exemplos são *Aloe vera* (babosa), *Medicago sativa* (alfafa), *Syzygium cumini* (jamelão), *Glycine max* (soja), *Bauhinia variegata* (pata-de-vaca) entre outras (GARDEA-Torresdey et al., 2002; KUMARI, KUMAR e YADAV, 2012).

### 3.7. EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS E PARA A AGRICULTURA

Nanomateriais biossintetizados são benéficos para a agricultura devido à preservação e aumento do tempo de prateleira de frutas e verduras, controle de fitopatógenos e também promovem o crescimento de plantas (FAYAZ, 2009).

Tem-se aumentado o interesse em relação à síntese verde e ao uso de nanopartículas de cobre e outros metais a exemplo a prata, como agentes potencialmente antimicrobianas contra patógenos de plantas, especialmente, em decorrência do desenvolvimento de resistência pelos patógenos aos fungicidas existentes. Fungicidas têm sido usados há muitos anos para o controle de doenças de plantas cultivadas. No entanto, muitos desses produtos possuem restrições de uso por inúmeras razões incluindo questões de segurança humana no que diz respeito ao uso de fungicidas químicos (MARCATO et al., 2012).

Diante disso o emprego de nanopartículas como agente antimicrobiano tem-se intensificado, visto que esse método traz uma abordagem diferente para o uso dos sais metálicos que já são comumente conhecidos como agentes antimicrobianos tanto em doença de humanos quanto de plantas.

A seguir abordam-se alguns trabalhos que utilizam desse recurso para o controle de microrganismos patogênicos.

Jung et al., (2008) trabalhando com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificaram que a presença de íons de prata observados no citoplasma de células bacterianas após o tratamento com nanopartículas de prata, sugerem que pode haver uma interação com ácidos nucleicos que provavelmente resulta em comprometimento da replicação do DNA, tendo efeitos inibitórios e letais sobre estas espécies.

Antunes et al., (2014) ao trabalhar para sintetizar NPs de Ag, por redução química, e caracterização utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), avaliaram a eficiência antimicrobiana NPAg frente a *E. coli* e *S. aureus*. Neste estudo, os antibiogramas revelaram que apenas a solução coloidal de 1000 ppm apresentou atividade antimicrobiana em relação as bactérias testadas.

Kim et al., (2007) ao testarem nanopartículas de Ag em várias concentrações utilizando placas de ágar Muller Hinton, sobre leveduras, *S. aureus* e *E. coli*,

verificaram que em levedura e *E. coli* as nanopartículas efetivamente inibiram o crescimento apresentando atividade antimicrobiana em baixas concentrações de Ag. Já em *S. aureus* houve menor efeito inibitório.

Outro estudo utilizando nanopartícula é o de Medda et al., (2015), com o objetivo de realizar a síntese verde de nanopartículas de prata empregando extrato de folha aquosa de *Aloe vera*, para testar a atividade antifúngica dessas nanopartículas contra *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. Os resultados obtidos mostraram que as nanopartículas sintetizadas apresentaram maior atividade antimicrobiana contra *Aspergillus* sp. do que contra *Rhizopus* sp., com inibição máxima do crescimento de hifas fúngicas. Pela observação microscópica revelou-se que as nanopartículas causaram redução na germinação de conídios, junto a outras deformações na estrutura da membrana celular. Bem como, inibiu o processo de brotação normal de ambas as espécies testadas, concluindo que a folha de *A. vera* é promissora para a síntese de nanopartículas de prata com enorme potencialidade para o controle de fungos patogênicos.

Em ensaio *in vivo* com plantas de milho infectadas com a bactéria *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho Mota (2019), tratou as plantas com nanopartículas de óxido de zinco dopadas com cobre (Cu), manganês (Mn), ferro (Fe) e níquel (Ni) em variadas concentrações. Nesse estudo constataram-se que as plantas tratadas com nanopartículas de óxido de zinco dopadas com Cu na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , apresentaram um maior controle sobre a mancha branca do milho.

Masum e colaboradores (2019), utilizando nanopartículas de prata biossintetizadas a partir do fruto fresco de *Phyllanthus emblica* observaram que as NPMs de Ag sintetizadas a  $20 \text{ } \mu\text{g.mL}$  exerceram atividade antimicrobiana sobre o patógeno *Acidovorax oryzae*, cepa RS-2, causador da faixa marrom bacteriana do arroz. Afetando seu crescimento e por consequência a sobrevivência celular e a formação de biofilme.

Em estudo SHENDE, GAIKWAD e BANSOD, (2016), testaram nanopartículas de cobre (NPMs Cu) biossintetizadas a partir do extrato de folhas de *Ocimum sanctum*, sobre diversos patógenos de plantas. O efeito antimicrobiano das nanopartículas biossintetizadas foi analisado com base na zona de inibição. Nesse trabalho os autores relatam que a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* causador da ferrugem bacteriana da romã e o fungo *Alternaria carthami* agente

causal das manchas foliares em cártamo foram os mais impactados pela ação antimicrobiana das nanopartículas de cobre.

Em todos esses trabalhos verifica-se que a pesquisa sobre a ação antimicrobiana das nanopartículas biossintetizadas é promissora, se tornando uma estratégia de gestão eficaz e ecologicamente mais viável. Abrindo espaço para serem empregados no campo da agricultura, na formulação biopesticidas, inseticidas, entre outros produtos.

### 3.8. APLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS E PARA A AGRICULTURA

A busca por uma vida mais saudável e que cause menor impacto ao ambiente tem sido intensa por parte da sociedade, e este fato impulsiona a comunidade científica a encontrar alternativas de controle das doenças (SILVA et al., 2009; SOUZA JÚNIOR et al., 2009). Deste modo, a utilização de extratos vegetais tem alcançado resultados eficientes, e com menores riscos de poluição e intoxicação aos funcionários e consumidores (SANTOS et al., 2013).

As plantas apresentam em sua constituição metabólitos secundários, e a exploração de sua atividade biológica, por meio de extratos aquosos e óleos essenciais são capazes de atuarem como indutores de resistência (SANTOS et al., 2007), e agirem diretamente sobre os microrganismos causadores de doença, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, e ainda pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (MILANESI et al., 2009). Esta prática de manejo minimiza os efeitos negativos do uso de pesticidas e proporciona a produção de alimentos mais saudáveis (SOUZA JÚNIOR et al., 2009).

Dentre os metabólitos presentes nos extratos vegetais e que podem ter efeito sobre o controle de fungos fitopatogênicos e outros organismos destacam-se os flavonoides, clerodanos, diterpenos, triterpenos presentes em carqueja (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005), o eugenol, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis presentes no cravo-da-índia (SILVESTRE et al., 2010) e a alicina, presente na composição do alho (CARLI, 2011).

O eucalipto é uma espécie muito explorada no Brasil para a extração de óleos essenciais, pelos compostos químicos: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos entre outros. O

cineol é o componente mais abundante do eucalipto que tem maior interesse medicinal e econômico. No Brasil a espécie produtora de óleo rica em cineol é o *Eucalyptus glóbulos* (VITTI e BRITO, 2003).

O emprego de extratos, chás ou sucos de plantas, se tornou um tratamento alternativo, porém, viável no combate a muitas pragas (PENTEADO, 2001), entre as quais incluem as doenças de plantas (SILVA et al., 2009), visto que essas enfermidades contribuem significativamente para a diminuição na produção de alimentos (SOUZA JÚNIOR et al., 2009).

Avaliando a eficiência do extrato de alho (*Allium sativum*), Souza et al. (2007), constataram inibição do desenvolvimento do fungo *Fusarium proliferatum*, e inclusive reduziu a incidência de tombamento e podridão do colmo em plântulas de milho, aumentando a germinação de suas sementes. Dentre as espécies medicinais com potencial no controle de patógenos destaca-se também, o cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) que apresenta atividade nematicida, inseticida, antiviral, bactericida e fungicida (MAZZAFERA, 2003). O óleo essencial e o extrato de cravo apresentaram-se como inibidores do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (PIERRE, 2009; SILVA et al., 2012).

Utilizando extratos aquosos no controle dos fitopatógenos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora kikuchii*, *F. solani* e *Phomopsis* sp., Venturoso et al. (2011), constataram inibição do crescimento micelial com uso do extrato de cravo-da-índia na concentração de 20 %. Os extratos de alho e canela na mesma concentração reduziu significativamente o crescimento de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp. e *Cercospora kikuchii*. Ao terceiro dia de incubação não foi constatado crescimento micelial para o fungo *Fusarium solani* no extrato de alho e de *Cercospora kikuchii*, na presença do extrato de alho e canela.

Ao avaliarem o efeito de extratos de vinte e duas espécies de plantas sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, Celoto et al. (2008), verificaram que o extrato aquoso e hidroetanólico de melão de são caetano (*Momordica charantia*) e extrato hidroetanólico de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) foram os mais eficientes na inibição do crescimento micelial.

Haja vista o abordado nessa revisão, os extratos vegetais vem de encontro com inquietações levantadas pela sociedade em relação aos impactos agrícolas no ambiente. Considerando que doenças de plantas é um fator relevante na

agricultura brasileira, faz-se necessário uma busca constante por meios que ajudem a minimizar ou controlar os microrganismos fitopatogênicos. E que também contribua para o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, S. D. J. **SELEÇÃO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM ACESSOS DE MANDIOCA**. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Bahia, 2013.
- AGRIOS, G. N. **PlantPathology**. 5 Ed. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Academic Press, 2005.
- AKHTAR, S.; CHANDRASEKHAR, B.; ATTUR, S.; YOUSIF, M. H. M.; BENTER, I. F. On the nanotoxicity of PAMAM dendrimers: Superfect® stimulates the EGFR–ERK1/2 signal transduction pathway via an oxidative stress-dependent mechanism in HEK 293 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 239–246, 2013.
- ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANOLA, M. Synthesis, characterization and application of silver nanoparticles as antimicrobial agents. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20-26, 2013.
- ANJOS, J. R. N.; SILVA, M. S.; VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F. Principais Doenças da Mandioca no Cerrado. In: VIEIRA, E.A. & FIALHO, J. F. Mandioca no Cerrado. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, p. 118-121, 2011.
- AQUILES, K. R. **PROPAGAÇÃO RÁPIDA DE *Manihot esculenta* (Crantz), E REAÇÃO DE ACESSOS DE MANDIOCA A *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***. Dissertação de mestrado em Agronomia, Universidade de Brasília – UNB, Brasília – DF 2014.
- BAKER, S.; RAKSHITH, D.; KAVITHA, K. S.; SANTOSH, P., KAVITHA, H. U.; RAO, Y.; SATISH, S. Plants: Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. **Bio impacts**, v. 3, n. 3, p. 111-7, 2013.
- BRADBURY, J. F. Genus. II. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, v. 1. p.199-210, 1984.
- BRADBURY, J. F. Guide to Plant Pathogenic Bacterial. Wallingford, UK. **CAB International**, 1986.
- CARLI, M. C. **Compostos orgânicos voláteis e extrato de alho no controle de *Meloidogyne incognita***. Dissertação de mestrado em Agronomia - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011. 60p.
- CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A.; PÉREZ, J. C.; DIXON, A. G. O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n.4, p. 503-516, 2004.
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.30, n.1, p.1-5, 2008.

CHETTY, C.C.; ROSSIN, C.B.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H.; REY, M.E. Empowering biotechnology in southern Africa: establishment of a robust transformation platform for the production of transgenic industry-preferred cassava. **New Biotechnology**, v. 30, p. 136–143, 2013.

CHUN, W. W. C. Xanthomonadins, Unique Yellow Pigments of the Genus *Xanthomonas*. **The Plant Health Instructor**, 2002. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/Xanthomonadins.aspx>>. Acesso em: 19 janeiro de 2019.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Mandioca. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca>>. Acesso em: 25 de novembro de 2019.

CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S. C.; MALDERGHEM, V.; VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, p. 792–806, 2016.

DURÁN, N.; PRISCYLA, D.; MARCATO, O. L. A., SOUZA, G. I. H., ESPÓSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains". **J. Nanobiotechnol**, v. 3, n. 8, 2005.

EMBRAPA Amazonia Oriental. **Mandioca em números**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>. Acesso em: 25 de novembro de 2019.

FANOUE, A. A.; ZINSOU, V. A.; WYDRA, K. Cassava bacterial blight: a devastating disease of cassava. In: WAISUNDARA, V. **Cassava. In Tech**, Rijeka, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT – FAO's corporate data base. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2017. FAOSTAT Statistical Data base, Statistical Division. Rome (2019).

FARAMARZI, M. A.; SADIGHI, A 2013. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. **Advances in Colloid and Interface Science**.189-190:1-20.

FAYAZ, A. M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; KALAICHELVAN, P. T.; VENKATESAN, R. Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. **J. Agric. Food Chem**, v. 57, p. 6246-6252, 2009.

FERREIRA FILHO, J. R.; SILVEIRA, H. F.; MACEDO, J. J. G.; LIMA, M. B.; CARDOSO, C. E. L (2013). Cultivo, processamento e uso da mandioca: instruções práticas. **Embrapa**, Brasília – DF.

FONSECA, N. S. J.; GROXKO, M.; RODANTE, A.; TAKAHASHI, M.; PEQUENO, G.; FILHO, P. S. V. **Cadeia Produtiva da Mandioca no Paraná: diagnóstico e demandas atuais**. Londrina: IAPAR, p. 53, 2002.

FURLANETO, F. P. B (2011). Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 2.

GADE, A.; GAIKWAD, S.; TIWARI, V.; YADAV, A.; INGLE, A., RAI, M. Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia affinis-indica*: in vitro antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis". **Current Nanoscience**, v. 6, n. 4, p. 370-375, 2010.

GNANADESIGAN, M.; ANAND, M.; RAVIKUMAR, S.; MARUTHUPANDY, M.; ALI, M. S.; VIJAYAKUMAR, V.; KUMARAGURU, A. Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using *Avicennia marina* mangrove plant. **Applied Nanoscience**, v. 2, n. 2, p. 143-147, 2012.

GARDEA-TORRESDEY, J. L.; TIEMANN, K. J., PARSONS, J. G.; GAMEZ, G.; YACAMAN, M. J. Characterization of trace level Au(III) binding to alfalfa biomass (*Medicago sativa*) by GFAAS. **Advances in Environmental Research**, v. 6, n. 3, p. 313-23, 2002.

GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, Marc. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol 77, n 5, p. 1541–1547, 2011.

GROZA, J. R. E.; GIBELING, J. C. Principles of particle selection for dispersion strengthened copper. **Materials Science and Engineering**, v. 171, n 1, 1993, 115-125.

HILLOCKS, R. J.; WYDRA, K. Bacterial, Fungal and Nematode disease. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Ed.). *Cassava: Biology, Production and Utilization*. New York - USA: **CAB International**, p. 261-280, 2002.

IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro v.30 n.1 p.1-81 janeiro 2017.

INGALE, S. V.; UMAMAHESWARA SASTRY, P.; WAGH, P. B.; TRIPATHI, A. K.; TEWARI, R.; JAYAKRISHNAN, V. B.; GUPTA, S. C. Preparation of Nano-Structured RDX in a Silica Xerogel Matrix. **Propellants, Explosives, Pyrotechnics**, v. 38, n. 4, p. 515–519, 2013.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**. v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011.

IULIANELLI, G. C. V.; TAVARES, M. I. B (2011). Caracterização de diferentes amostras de mandioca por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. **Polímeros**, v.21, n.2, p.131-136.

JUNG, W. K.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 74, n. 7, p. 2171-2178, 2008.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D. H.; CHO, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 95– 101, 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

KUMARI, A.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant Extract Synthesized PLA Nanoparticles for Controlled and Sustained Release of Quercetin: A Green Approach. **Plos One**, v. 7, n. 7, 2012.

LÓPEZ, C.; RESTREPO, S.; VERDIER, V. Limitations of Cassava Bacterial Blight: New Advances. **Acta Biológica Colombiana**, Bogotá, v. 11, n. 25, p. 21-42, 2006.

LUKMAN, A. I.; GONG, B.; MARJO, C. E.; ROESSNER, U.; HARRIS, A. T.; Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 353, n. 2, p. 433-444, 2011.

MANSFIELD, J. GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; † RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. T.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629.

MARCATO, P.D.; DURAN, M.; HUBER, S.; RAI, M.; MELO, P.S.; ALVES, O.L., DURAN, N. Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery. **J. Nano Res**, v. 20, p. 99-107. 2012.

MARK. H. F.; OTHMER, D. F.; OVERBERGER; C. G.; SEABORG, G. T. KIRK-OTHMER. **Encyclopedia Chemical Technology**, 5 Ed. Wiley, Nova York, 2005.

MASSOLA, N. S. J. & BEDENDO, I. P. Doenças da Mandioca (*Manihot esculenta*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A (2005). (Ed.). **Manual de Fitopatologia. V. 2 Doenças das plantas cultivadas**. 4 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, p. 449-450.

MASUM, M. I.; SIDDIQA, M.; ALI, K.; ZHANG, Y.; ABDALLAH, Y.; IBRAHIM, E.; QIU, W., YAN, C.; LI, B. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblica* fruit extract and its antibacterial activity against rice brown stripe pathogen *Acidovorax oryzae*. **Front. Microbiol.** 10:820, 2019.

MATHIAS, F. T., ROMANO, M. A., ROMANO, R. M. Avaliação dos Efeitos Toxicológicos e Ambientais de Nanopartículas de Sais de Prata. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 2, p. 187-193, 2014.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.2, p.231-238, 2003.

MEDDA, S., HAJRA, A., DEY, U., BOSE, P., MONDAL, N. K. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus sp.* and *Aspergillus sp.* **Appl Nanosci**, v. 5, p. 875–880, 2015.

MELO Jr, M. A., SANTOS, L. S. S., GONÇALVES, M. C. NOGUEIRA, A. F. Preparation of silver and gold nanoparticles: a simple method to introduce nanotechnology into teaching laboratories. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MILANESI, P. M.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B; BRAND, S. C.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G.; WEBE, M. N. D. Ação fungitóxica de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista da FZVA**, Uruguiana, v.16, n.1, p.01-13. 2009.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**; v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013.

MOSES, E.; ASAFU-AGYEI, J. N.; ADUBOFOUR, K.; ADUSEI, A. Guide to Identification and Control of Cassava Diseases. **CSIR-Crops Research Institute**. Kumasi Ghana, 41 p, 2007.

MOTA, R. P. **Agressividade, caracterização molecular de isolados de *Pantoea ananatis* e nanopartículas no controle da bactéria na cultura do milho**. Dissertação de Mestrado em agronomia, Instituto de Ciências Agrárias Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2019.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59-79, 2011.

OLIVEIRA, S. A. S.; FREITAS, J. P. X.; AUD, F. F.; SANTOS, V. S.; OLIVEIRA, E (2013).J. Resistência de genótipos de mandioca (*Manihotesculenta*Crantz) à Mancha- Parda, queima das folhas e Mancha-Branca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 15., 2013, Salvador. Inovação e sustentabilidade: da raiz ao amido: trabalhos apresentados. Salvador: **CBM: Embrapa**.

OLIVEIRA, S. A. S.; SILVA, M. A.; RANGEL, M. A. S.; SANTOS, V. S. RINGENBERG, R. OLIVEIRA, E. J. Metodologia para avaliação da resistência da mandioca à bacteriose, antracnose e superalongamento. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura), p. 21, 2016.

OTSUBO, A. A.; PEZARICO, C. R. A. **Cultura da Mandioca em Matogrosso do Sul**. In: OTUSUBO, A. A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. S. Aspecto do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados/MS, UNIDERP, p. 31-47, 2002.

PARET, M. L.; VALLAD, G. E.; AVERETT, D. R.; JONES, J. B.; OLSON, S. M. Photocatalysis: effect of light-activated nanoscale formulations of TiO<sub>2</sub> on *Xanthomonas perforans* and Control of Bacterial Spot of Tomato. **PHYTOPATHOLOGY**, v. 103, n. 3, p. 228–236, 2013.

PENTEADO, S. R. **Agricultura orgânica**. Piracicaba: ESALQ, 2001. 41p.

PIERRE, R. O. **Óleo essencial e extrato de cravo-da-índia no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha mateigosa, em sementes e mudas de café**. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 61, 2009.

PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA. Disponível em: <[http://lqes.iqm.unicamp.br/canal\\_cientifico/lqes\\_news/lqes\\_news\\_cit/lqes\\_news\\_2006/lqes\\_news\\_novidades\\_769\\_fapesp\\_violaceina.pdf](http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_news/lqes_news_cit/lqes_news_2006/lqes_news_novidades_769_fapesp_violaceina.pdf)>. Acesso em: 29 de agosto de 2019.

QUELEMES, P. V.; ARARUNA, F. B.; FARIA, B. E. F.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SILVA, D. A.; MENDONÇA, R. Z.; EIRAS, C.; SOARES, M. J. S.; LEITE, J. R. S. A. Development and Antibacterial Activity of Cashew Gum-Based Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n. 3, p. 4969-4981, 2013.

RACHE, L.; BLONDIN, L.; FLORES, C.; TRUJILLO, C.; SZUREK, B.; RESTREPO, S.; KOEBNIK, R.; BERNALE, A. VERNIÈRE, C. An optimized microsatellite scheme for assessing populations of *Xanthomonas phaseolipv. Manihotis*. **Phytopathology**, v. 109, n. 5, 2019.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Cienc. Cult.** v. 65, n.3, São Paulo, 2013.

SAHAYARAJ, K.; RAJESH, S (2011). Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Ed. A. Méndez Vilas, p. 228-244.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; RESENDE, M. L. V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M; MANERBA, F. C. Efeito de extratos vegetais no processo de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.1, p.59-63,2007.

SANTOS, P. L.; PRANDO, M. B.; MORANDO, R.; PEREIRA, G. V. N.; KRONKA, A. Z. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17, p.2562-2576, 2013.

SANTOS, V. S. MANDIOCA: A RAIZ DAS NOSSAS RAÍZES. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/874157/1/httpagrosoft.compdfVANDERLEI.pdf>. **AGROSOFT BRASIL**, Publicação: 30-12-2010.

SATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; WON, S. W.; CHO, C. W.; KIM, S.; YUN, Y. S. *Cinnamomum zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 332-338, 2009.

SEBRAE BAHIA. **Mandiocultura: derivados da mandioca**. Integra consultoria e representação e comercio, Salvador, 40p, 2009.

SHAMELI K, BIN AHMAD, M.; JAFFAR AL-MULLA, E. A.; IBRAHIM, N. A.; SHABANZADEH, P.; RUSTAIYAN, A.; ABDOLLAHI, Y.; BAGHERI, S.; ABDOLMOHAMMADI, S.; USMAN, M. S.; ZIDAN, M. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Callicarpamaingayi* stem bark extraction. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8506-8517, 2012.

SHANKAR, S. S. et al. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. **Nature Materials**, v. 3, n. 7, p. 482–488, 2004.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.

SHENDE, S. S.; GAIKWAD, N. D.; BANSOD, S. D. Synthesis and evaluation of antimicrobial potential of copper nanoparticle against agriculturally important Phytopathogens. **International Journal of Biology Research**, v. 1, n. 4; p. 41-47, 2016.

SHUKLA, R.; NUNE, S. K.; CHANDA, N.; KATTI, K.; MEKAPOTHULA, S.; KULKARNI, R. R.; KATTI, K. V. Soybeans as a phytochemical reservoir for the production and stabilization of biocompatible gold nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 9, p.1425-1436, 2008.

SILVA, A. C.; ARAÚJO, A. V.; CALDEIRA JÚNIOR, C. F. C. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazerio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, edição especial, p.1853-1860, 2009.

SILVA, H. S. A.; ANDRADE, E. C.. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da mandioca no Brasil. In: GHINI, R., HAMADA, E., BETTIOL, W. Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 356, 2011.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V.; SANTOS, D. I. P.; PESSOA, J. O. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde**, Mossoró, v.7, n.1, p.80-86, 2012.

SILVA, L. D. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancorniaspeciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, 2014.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L. POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotechnologia aplicada à agroindústria: fundamentos e aplicações**, v. 4. p. 967-1011, 2016.

SILVESTRE, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.57, n.5, p.589-594, 2010.

SINGH, D. Use of metallic nanoparticles to improve the thermophysical properties of organic heat transfer fluids used in concentrated solar power. **Solar Energy**, v. 105, p. 468-478, 2014.

SINHA, S.; PAN, I.; CHANDA, P.; SEN, S. K. Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. **Journal of Applied Biosciences**, v. 19, p. 1113-1130, 2009.

SOUZA, E.; SILVA, M.; SILVA, S. A cadeia produtiva da mandiocultura no vale do Jequitinhonha (MG): Uma análise dos aspectos sócio produtivos, culturais e da geração de renda para a Agricultura familiar. **ISEGORIA, Ação Coletiva em Revista**. Ano 1, vol. 1, n. 2, 2012.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v.22, n.3, p.77-83, 2009.

SOUZA, L. S.; FIALHO, J. F. **Cultivo da Mandioca para a Região do Cerrado**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistemas de Produção, p. 1678-8796 Versão eletrônica Jan/2003.

STORZ, G. IMLAY, J.A. Oxidative stress. **Curr. Opin. Microbiol.** V. 2, p.188–194, 1999.

SUNDIN, G.W.; CASTIBLANCO, L.F.; YUAN, X.; ZENG, Q.; YANG, C. H. Bacterial disease management: challenges, experience innovation and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 9, p. 1506–1518, 2016.

SUR, U. K. Biological green synthesis of gold and silver nanoparticles. **Advances in Nano Research**, v. 2, n. 3, p. 135–145, 2014.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

TKACHA, V.; OJANIB, R.; NECHYPORUKA, V.; YAGODYNETS, P. A Descrição Matemática do Desempenho Eletroanalítico de Nanopartículas de Óxido de Cobre (II) na Eletrodeteção de Hidrazina. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, 2014.

TREMACOLDI, C. R. **Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará**. In: MODESTO JUNIOR, M. de S.; ALVES, R. N. B. Cultura da mandioca. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

VALLE, T. L., LORENZI, J. O. Improved varieties of cassava as a tool of innovation, food safety, competitiveness and sustainability: contributions of the agronomic institute of Campinas (IAC). **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 15-34, 2014.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; SILVA, M.S. **Recursos genéticos e melhoramento da mandioca**. In: Fialho, J. F.; Vieira, E. A. (Ed.). Mandioca no Cerrado: orientações técnicas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2. p. 5-35, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, K.; NALINI, S.; PRAKASH, N. U.; MADHANKUMAR, D. One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 114-117, 2012.

VELAYUTHAM, K.; RAHUMAN, A. A.; RAJAKUMAR, G.; ROOPAN, S. M.; ELANGO, G.; KAMARAJ, C.; MARIMUTHU, S.; SANTHOSHKUMAR, T.; IYAPPAN, M.; SIVA C. Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 2, p. 95-101, 2013.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. São Paulo: ESALQ, 2003. 30p. (Documentos florestais, n.17). institute of Campinas (IAC). **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 15-34, 2014.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clin. Pharmacol. Ther**, v. 83, p. 761–769, 2008.

## 4. CAPÍTULO II

**“Aplicação de nanopartículas de cobre e prata biossintetizadas para o controle de *xanthomas phaseoli* pv. *manihotis*”**

## **Aplicação de nanopartículas de cobre e prata biossintetizadas para o controle de *xanthomas phaseoli* pv. *manihotis***

Adrielle Santos da Silva<sup>(1)</sup>, Luciano Ricardo Braga Pinheiro<sup>(2)</sup>, Harllen Sandro Alves Silva<sup>(2)</sup>, Saulo Alves Santos de Oliveira<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710 44380- 00, Cruz das Almas, Brasil. E-mail: adrielle.bms@gmail.com

<sup>(2)</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa s/n 44380-000, Cruz das Almas, Brasil. E-mail: Luciano.braga@embrapa.br, harllen.alves@embrapa.br, saulo.oliveira@embrapa.br

**RESUMO:** As combinações das 20 plantas utilizadas com os dois sais metálicos, mais os controles resultaram num total de 846 tratamentos. Essas combinações foram avaliadas *in vitro* sobre *Xanthomas phaseoli* pv. *manihotis* para determinação da eficiência sobre formação de nanopartículas e inibição do crescimento de Xpm. Aqueles que apresentaram percentual de inibição superior a obtida para o tratamento controle de estreptomicina 1000 µg.mL<sup>-1</sup> foram considerados os melhores tratamentos. No teste de sensibilidade a antimicrobianos os extratos que mais se destacaram na combinação com cobre para inibição do crescimento bacteriano de Xpm foram coentro, aroeira, gengibre, cominho e tansagem. No caso de prata a melhor combinação foi o extrato de boldo a 500 µg.mL<sup>-1</sup> associado a prata a 10 mM. Os tratamentos também foram submetidos à caracterização por espectroscopia UV-vis e potencial zeta. De acordo essas análises as combinações com prata indicam a formação das nanopartículas, já para as combinações com cobre não é observado a biossíntese de NPs. Os melhores dados obtidos da análise estatística inicial foram submetido ao programa SigmaPlot 11.0 para estimar a concentração ótima. A partir dos ensaios avaliando a eficiência das melhores concentrações originais versus as concentrações estimadas, foi evidenciado que o extrato de eucalipto estimado combinado cobre 100mM foram mais eficientes em inibir o crescimento de Xpm. Todos os extratos explorados figuraram entre os 80 melhores. Demonstrando que as possibilidades de utilização de plantas como via de síntese biológica para obtenção de nanopartículas são inúmeras.

**Palavras chave:** Síntese biológica, extratos vegetais, potencial bioativo

**ABSTRACT:** The combinations of the 20 plants used with the two metallic salts, plus the controls resulted in a total of 846 treatments. These combinations were evaluated in vitro on *Xanthomas phaseoli* pv. *manihotis* for determining the efficiency on formation of nanoparticles and inhibiting Xpm growth. Those with an inhibition percentage higher than that obtained for the control treatment of streptomycin 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  were considered the best treatments. In the antimicrobial sensitivity test, the extracts that stood out the most in the combination with copper to inhibit the bacterial growth of Xpm were coriander, mastic, ginger, cumin and tannin. In the case of silver, the best combination was the boldo extract at 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  associated with 10 mM silver. The treatments were also subjected to characterization by UV-vis spectroscopy and zeta potential. According to these analyzes, combinations with silver indicate the formation of nanoparticles, whereas for combinations with copper, the biosynthesis of NPs is not observed. The best data obtained from the initial statistical analysis were submitted to the SigmaPlot 11.0 program to estimate the optimal concentration. From the tests evaluating the efficiency of the best original concentrations versus the estimated concentrations, it was evidenced that the estimated combined eucalyptus extract copper 100mM were more efficient in inhibiting the growth of Xpm. All extracts explored were among the 80 best. Demonstrating that the possibilities of using plants as a pathway for biological synthesis to obtain nanoparticles are numerous.

**Keywords:** Biological synthesizer, plant extracts, bioactive potential

## 5. INTRODUÇÃO

A raiz de mandioca apresenta em sua composição um significativo teor de amido, representando uma das mais importantes fontes de carboidrato, e em menores quantidades proteínas e minerais para a alimentação de bilhões de pessoas, essencialmente nos países tropicais e em desenvolvimento como no Brasil (IULIANELLI E TAVARES, 2011; FERREIRA FILHO et al., 2013; CHETTY et al., 2013).

O cultivo da mandioca é comum em todo território brasileiro, sendo umas das culturas de maior representatividade socioeconômica nas regiões produtoras. Isso se dá devido ao seu cultivo ser conduzido principalmente por agricultores familiares, que tem nessa atividade sua principal fonte de renda (SOUZA, SILVA e SILVA et al., 2012; FERREIRA FILHO et al., 2013).

Não diferente de outras culturas o cultivo da mandioca possui diversos fatores que provocam queda da produtividade, dentre os quais diversos patógenos, que induzem podridões internas ou externas e cancrios, que invadem os tecidos lenhosos do caule.

A bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* figura entre as principais doenças da cultura, e no Brasil ocasiona maiores perdas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

Para o controle da bacteriose são recomendadas algumas medidas preventivas ou o uso de agroquímicos a fim de controlar a propagação do patógeno. No entanto, somente a prevenção não é suficiente, e os microrganismos desenvolvem resistência aos bactericidas e fungicidas já existentes. Visto esse cenário se faz necessária a busca por novas tecnologias para o controle sobre esse patógeno (MASSOLA e BEDENDO, 2005; MOSES et al., 2007; MARCATO et al., 2012).

Como uma nova estratégia de controle a ser aplicada para o manejo da bacteriose da mandioca, vem se intensificando as pesquisas utilizando as nanopartículas como agente antibacteriano (SUNDIN et al., 2016). Principalmente com base no princípio da nanotecnologia verde que utiliza um organismo biológico ou parte dele para fazer a biossíntese das NPMs (MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013). A biossíntese de NPMs por intermédio das plantas é uma prática crescente no meio científico. Essa prática ganha força devido à elevada capacidade de

diversas plantas em promoverem a formação das NPMs (IRAVANI, 2011; BAKER et al., 2013; INGALE, 2013; MITTAL, CHISTI e BANERJEE, 2013).

Nanotecnologia verde é uma abordagem que esta em sintonia com a busca por meios mais sustentáveis de produção em que utilizam métodos e materiais que visam à geração de produtos com menor impacto ambiental (NARAYANAN, SAKTHIVEL 2011). No manejo de doenças de plantas o tamanho da partícula desempenha um papel central na atividade antimicrobiana. Nanopartículas de prata e cobre, com formulações, tamanhos e formas variáveis exercem diferentes níveis de atividade antimicrobiana (DURÁN et al., 2010).

Na literatura há diversos trabalhos que abordam a biossíntese de NPMs e sua ação antimicrobiana. A exemplo disso, Medda et al. (2015), com o objetivo de realizar a síntese verde de nanopartículas de prata usando extrato de folha aquosa de *Aloe vera*, e avaliar sua atividade antifúngica contra *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. revelaram que as NPs apresentou maior atividade antimicrobiana contra *Aspergillus* sp. com inibição máxima do crescimento de hifas fúngicas. Bem como, inibiu o processo de brotação normal de ambas as espécies testadas, concluindo que a folha de *A. vera* é promissora para a síntese de nanopartículas de prata com elevada potencialidade para o controle de fungos patogênicos.

Outro trabalho que evidencia esse efeito é o de Shende, Gaikwad e Bansod, (2016). Que testando nanopartículas de cobre (CuNPs) biossintetizadas a partir do extrato de folhas de *Ocimum sanctum*, sobre diversos patógenos de plantas, relatam que a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* causador da ferrugem bacteriana da romã e o fungo *Alternaria carthami* agente causal das manchas foliares em cártamo foram os mais impactados pela ação antimicrobiana das nanopartículas de CuNPs.

Visto as propriedades das NPs abordadas até o momento, em que demonstram que a pesquisa sobre a ação antimicrobiana das nanopartículas biossintetizadas é promissora. Considerando o ganho de resistência dos microrganismos ao longo do tempo o emprego das nanopartículas biossintetizadas por vias biológicas como meio de controle de patógenos, garante que inúmeras possibilidades possam ser testadas, haja vista a abundancia de recursos vegetais que podem ser aproveitados. Essa tecnologia além de se configurar como uma estratégia ecologicamente mais viável. Abre espaço para serem empregados no

campo da agricultura, na formulação biopesticidas, inseticidas, entre outros produtos.

Apesar de haver variados relatos sobre a utilização das NPs de Ag e Cu como agentes antimicrobianos, ainda não são abundantes os estudos direcionados aos fitopatógenos recorrentes no Brasil como a bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. Diante do abordado, o objetivo desse trabalho é aplicar as nanopartículas de prata e cobre biossintetizadas a partir de extratos vegetais para controle da bacteriose de mandioca provocada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E CARACTERIZAÇÃO

A obtenção dos extratos vegetais aquosos se deu a partir de folhas secas e trituradas de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), neem (*Azadirachta indica*), melão são caetano (*Mamordica charantia*), eucalipto (*Eucalyptus glóbulos*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), mamão-papaya (*Carica papaya*), mamona (*Ricinus communis*), babosa (*Aloe vera*), losna (*Artemisia absinthium*), boldo (*Plectranthus barbatus*), cavalinha (*Equisetum arvense*), tansagem (*Plantago major*), botões florais de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus*), bulbos de alho (*Allium sativum*), sementes de cominho (*Cuminum cyminum*) e coentro (*Coriandrum sativum*), casca de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Barbatimão (*Stryphnodendron barbatimão*) e rizoma de gengibre (*Zingiber officinale*).

O material foi seco a 60 °C por três dias em estufas e triturado em liquidificador industrial até a consistência de pó. As plantas utilizadas foram adquiridas junto ao comércio local de Cruz das Almas, BA. Como fonte dos metais foram preparadas soluções de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) para posteriores combinações.

Para obtenção dos extratos ao material vegetal foi adicionado 100mL de água destilada esterilizada, em temperatura de 90 °C em 0.5 g de material vegetal permanecendo em infusão por cinco minutos. Após, o extrato foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos (HANDA et al, 2008).

Os extratos vegetais e as fontes metálicas foram avaliadas em diferentes concentrações, tanto de forma individual como combinadas, para determinação de quais favoreceriam a formação de nanopartículas e controle da bactéria. As concentrações do extrato utilizadas nos testes foram: 0; 2,5; 50; 500 e 2.500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para o nitrato de prata e sulfato de cobre: 0; 0,5; 5; 10; 50 e 100 mM. Como controles foram utilizados tratamentos com água destilada e o antibiótico estreptomicina nas concentrações de 0, 0,1; 10; 100 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Foram utilizados tubos Falcon para as combinações, com diluição de 1:1. A partir disso os tubos foram devidamente identificados e acondicionados à temperatura ambiente por 48 horas. Passado esse período essas combinações e concentrações foram testadas sobre a bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) para verificar quais apresentarão maior potencial de inibição sobre o desenvolvimento das colônias.

#### **6.1.1. Caracterização por espectrofotometria UV-vis e Potencial Zeta.**

Os tratamentos foram caracterizados pela avaliação de espectroscopia UV-visível em espectrofotômetro Thermo Scientific UV-Vis GENESYS™ 10S. Para essa análise 2 ml das soluções dos tratamentos foram postas em cubetas e lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda na faixa de 200 a 800 nanômetros. Essa técnica foi utilizada para monitorar a formação das nanopartículas pela análise do comprimento de onda, a fim de verificar em qual faixa ocorre a formação de curvas ou picos que indiquem a formação das nanopartículas.

A análise do potencial zeta, foi empregada para avaliar a distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica. Amostras dos melhores tratamentos advindo dos ensaios de originais versus estimados, foram enviadas para análise no Departamento de Química da Universidade de São Paulo.

## **6.2. SENSIBILIDADE DE XANTHOMONAS AOS ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO**

Para determinação da ação de inibição microbiana realizou-se um antibiograma em que colônias de *Xpm*, proveniente da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram submetidas *in vitro* ao contato com as nanopartículas obtidas (BAUER et al 1966).

Para tanto, inicialmente foi vertido 10 mL de agar-água em placas de Petri para uniformização da superfície. Após, colônias da bactéria crescidas em 25 mL por 24 horas em caldo nutriente (extrato de levedura, peptona e glicose (Y.P.G.)) foram incorporadas em 250 mL do mesmo meio de cultura a temperatura de 35 °C, e vertidos nas placas previamente preparadas. As placas foram reservadas até que o meio se solidificasse, quando os discos foram distribuídos.

Com o auxílio de uma pinça, discos esterilizados de 0,5 cm de diâmetro foram embebidos nas soluções que continham os tratamentos e depois distribuídos nas placas em pontos equidistantes, cada disco correspondendo a um tratamento. Concluída esta etapa, placas foram acondicionadas em incubadora B.O.D a 25 °C por 72 horas e avaliadas.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em fatorial duplo: (20 extratos x 5 concentrações) x (2 sais x 3 concentrações) + 2 controles, e 3 repetições para cada tratamento. Foi analisado a capacidade individual de formação de nanopartículas, controle das colônias bacterianas e determinação da melhor concentração de extratos e sais para a formação das nanopartículas.

A área de inibição foi mensurada utilizando o Software de análises de imagens *Assess* (American Pathological Society). A determinação da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) da bactéria foi obtida por meio da fórmula:  $PIC = \frac{[(\text{diâmetro do tratamento} \times 100)]}{\text{diâmetro do maior tratamento}}$ . Os resultados obtidos a partir da aplicação dessa fórmula foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott no Software estatístico R.

### 6.3. DETERMINAÇÃO DOS MELHORES TRATAMENTOS

Com os resultados obtidos após a realização da análise preliminar, antes da conclusão final dos experimentos para verificar quais os tratamentos que apresentaram maior potencial bioativo, foi realizado um novo ensaio com os 17 melhores tratamentos originais. Os extratos e sais que apresentaram as melhores combinações foram testados em suas concentrações originais e também nas concentrações ótimas estimadas.

Para estimar essa concentração ótima os dados de todos os tratamentos foram submetidos à análise no programa SigmaPlot 11.0 para gerar os gráficos de superfície de contorno.

Depois desse processo foram testados 17 tratamentos originais e 7 estimados, para determinação das melhores combinações para obtenção das nanopartículas.

Os tratamentos testados no ensaio de originais versus estimados também foram submetidos caracterização por espectroscopia UV-vis.

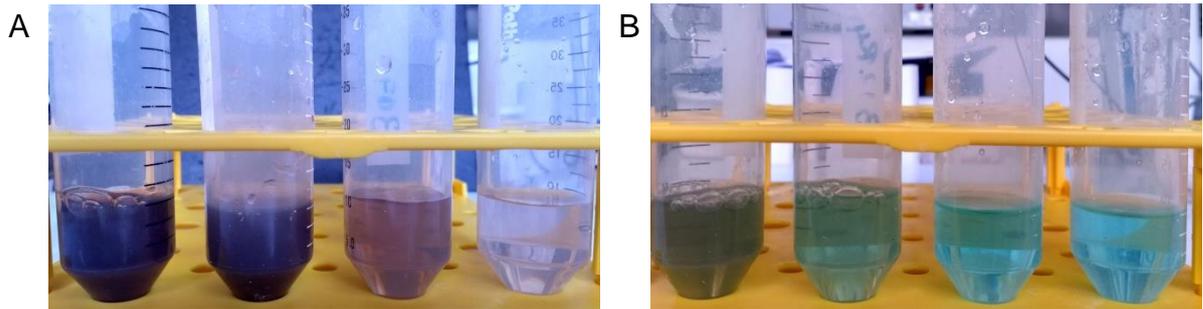
## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1. ANALISE DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS E POTENCIAL ZETA.

Analisando a mudança de coloração da reação entre os extratos vegetais e os sais de cobre e prata são verificados que para a prata assim que adicionado o extrato, ocorre uma mudança gradual na coloração. Essa coloração se apresenta mais escura para os tratamentos onde a concentração de Ag é maior. Essa mudança na coloração é um indicativo da síntese de nanopartículas (figura 1 A).

Já para o tratamento com cobre essa mudança de tonalidade não é verificada. Ocorrendo apenas uma leve alteração de cor nas combinações com a concentração do extrato a 500 e 2.500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  sugerindo que a mudança de cor esta apenas relacionada com a pigmentação extra obtida pela adição do extrato (figura 1 B).

Esse aspecto pode ser um indicativo da não formação ou de formação em baixa quantidade das nanopartículas nesse meio. No entanto, a análise de potencial zeta vem a corroborar com essa hipótese, pois de acordo com essa técnica os tratamentos de eucalipto a 268, coentro a 2,5 e 268, Aroeira a 1.344, gengibre a 50 e Alecrim a 250  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , combinados com cobre 100 mM não detectou a presença de nanopartículas nas amostras. Existe a possibilidade de realmente não ter formado as NPs, mas também esse resultado pode estar relacionado com a formação em baixa quantidade, inviabilizando a detecção pela análise do potencial zeta.

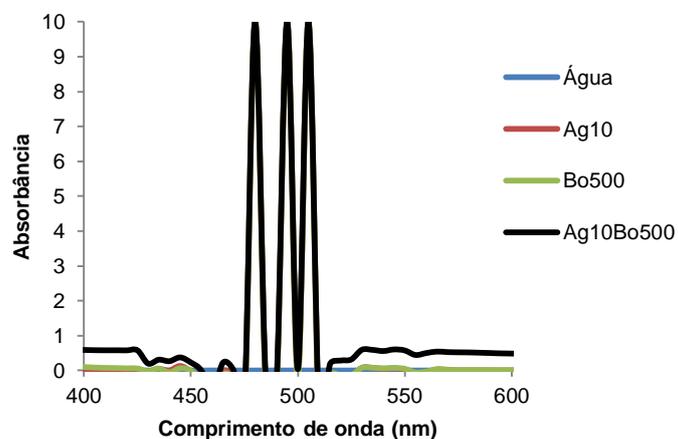


**Figura 01.** Reação de mudança de coloração com sal de prata (A) Reação de mudança de coloração com sal de cobre (B).

### 7.1.1. Espectroscopia UV-vis com sal de prata.

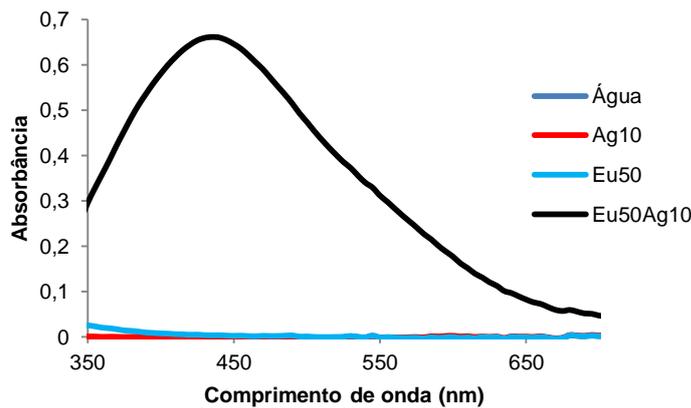
Ao fazer caracterização, por espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), para obter os perfis espectroscópicos do extrato de Boldo 500 e Eucalipto 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  combinados com sal de prata a 10 mM. Foi verificado que nessas combinações há o indicativo da formação de nanopartículas de acordo com a faixa de absorção esperada, vale ressaltar que essas combinações estão entre as melhores associadas com prata.

O perfil espectroscópico do extrato de boldo a 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  apresenta picos de absorção em diferentes comprimentos de onda. Para essa combinação são verificados 3 picos nas faixas entre 470 e 510 nanômetros (nm) (figura 02). Esse perfil está de acordo com o abordado sobre o padrão de mudança de coloração, ao comparar a combinação do extrato de boldo e prata com a água, a prata pura e o boldo bruto verifica-se que somente a combinação apresentou picos de absorção.



**Figura 02.** Perfil Espectroscópico UV-vis de boldo 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  com prata 10 mM

No extrato de eucalipto é verificada essa mesma tendência, quando comparado com a água, a prata pura e o eucalipto bruto (figura 03). Somente a combinação do extrato de eucalipto a 50 com sal a 10 mM apresentou a banda de absorção na faixa esperada. No entanto, nesse tratamento o pico máximo da faixa de absorção está na faixa de 450 nanômetros, indicando que houve a formação das nanopartículas.



**Figura 03.** Perfil Espectroscópico UV-vis de boldo  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  com prata 10 mM

Como visto os perfis obtidos para o extrato de boldo e eucalipto são diferentes, pois apresentam bandas de absorção em faixas distintas. Na biossíntese as diferentes estruturas presentes nas soluções possibilitam diferentes modos de vibração, essa oscilação nas vibrações resulta em diferentes espectros de absorção (BALLOTTIN, 2014).

A presença de variados picos em uma mesma combinação pode estar relacionada com diferentes morfologias das partículas no mesmo meio. Para o caso de boldo o perfil mostra faixa de absorção entre 470 e 510. De acordo com Kamat, 2002 e Mock et al., 2002, morfologicamente as AgNPs que estão no espectro de 400 nm apresenta formatos esféricos, enquanto que as partículas que apresentam absorção no espectro de 500 até 540 nm possuem o formato pentagonais.

O extrato de eucalipto por apresentar banda de absorção na faixa de 450 nm, sugere que essa característica se deve a geometria das partículas presentes no meio. De acordo com a literatura faixas em torno de 400-450 nm indica a presença de partículas de formato esférico (Noguez, 2007).

Visto isso é possível sugerir que as variações de perfis espectroscópicos dentro dos tratamentos testados são inúmeras. Ainda assim é possível que vários tratamentos estejam no perfil esperado, principalmente aqueles que apresentaram melhores desempenho no controle da bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

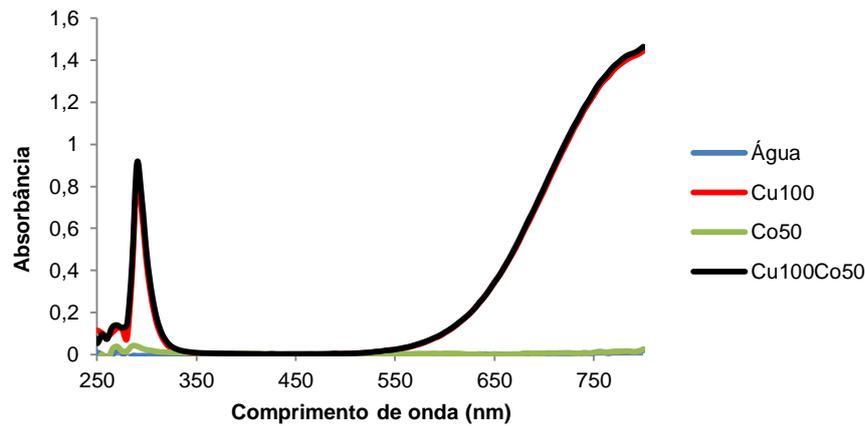
### **7.1.2. Espectroscopia UV-vis com sal de cobre**

Na caracterização por UV-Vis dos extratos de coentro e aroeira a  $50 \mu\text{g. mL}^{-1}$  com sal de cobre a 100 mM, foi verificado que não há o indicativo da formação de nanopartículas, visto que os picos de absorção obtido não estão em consonância com os normalmente descrito na literatura para as nanopartículas de cobre (CuNPs). Sugerindo que nesse caso pode ter ocorrido algum outro tipo de reação.

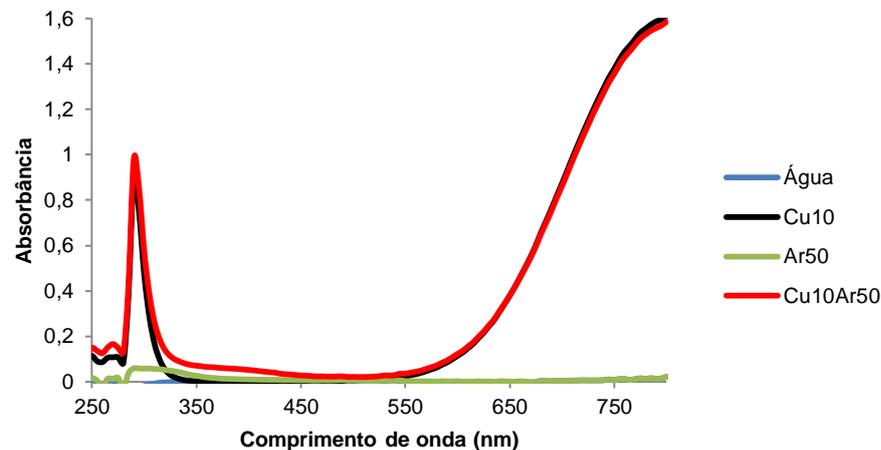
As combinações com o extrato de coentro e aroeira estão entre as melhores. Na análise final entre todos os tratamentos, foram essas associações que apresentaram maior potencial bioativo sobre *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

No perfil espectroscópico do extrato de coentro  $50 \mu\text{g. mL}^{-1}$  associado a cobre 100 mM é observado que existe uma banda de absorção com pico máximo na faixa de 300 nm, depois a absorção desaparece e ressurge a partir de 580 nm, com pico máximo em torno 800 nm (figura 04). A espectroscopia do extrato de aroeira  $50 \mu\text{g. mL}^{-1}$  com cobre 100 mM apresenta esse mesmo perfil (figura 05). Nesse caso, as combinações e o cobre puro, apresentam o mesmo perfil de absorbância.

Esse aspecto observado está de acordo com o fato de que não houve alterações na coloração. As análises de potencial zeta também não indicam formação de CuNPs. E se houve pode ter sido em quantidade insuficiente para ser detectado.



**Figura 04.** Perfil Espectroscópico UV-vis de coentro 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com cobre 100 mM



**Figura 05.** Perfil Espectroscópico UV-vis de aroeira 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com cobre 100 mM

Para os dois exemplos apresentados os picos de absorção se apresentam na faixa de 300 nm e 800nm. Os picos máximos de absorção podem estar até numa faixa mais elevada, no entanto não foi feito espectroscopia com comprimentos de onda maior que 800 nm.

No trabalho realizado por Freitas (2019), analisando a redução do nitrato de prata com própolis verificou que quanto maior a concentração do nitrato na solução maior era a absorbância. Quando testou a redução da prata a 50 mM com própolis verificou que não houve a formação de NPs, e a tendência da curva foi manter-se reta, não havendo picos de absorção.

Dado isso, existe a possibilidade de que nas UV-vis apresentadas, a elevação observada a partir de 580 nm seja em decorrência do aumento da quantidade de cobre na solução, pois essa elevação foi constatada tanto nas

combinações com coentro e aroeira, quanto no cobre testado puro. Outra possibilidade está relacionada a agregação de moléculas solução. O que conseqüentemente levaria a formação de partículas grandes. Em consonância com Wang, Rubner e Cohen (2002), quanto maior o tamanho das partículas de AgNPs, maior é a intensidade da banda de absorção.

De acordo com o descrito na literatura, a banda de absorção que indica a formação de nanopartículas de cobre geralmente está na faixa compreendida entre 500 a 600 nm (WANG et al., 2010; YALLAPPA et al., 2013).

Em pesquisa Eltz (2017), estudou filtros de ácido acrílico e hidrócloro de alilamina, impregnados com nanopartículas metálicas para desinfecção de efluentes industriais. Nesse trabalho verificou-se na análise UV-vis uma banda de absorção centrada na faixa de aproximadamente 320 nm. E segundo Rahman et al., 2009, essa faixa indica a formação de nanopartículas de óxido de cobre. Sugere-se que nas combinações com o cobre os compostos orgânicos também interagiram com os outros componentes presentes na fonte de cobre. Visto que esses espectros não apresentam bandas características de CuNPs.

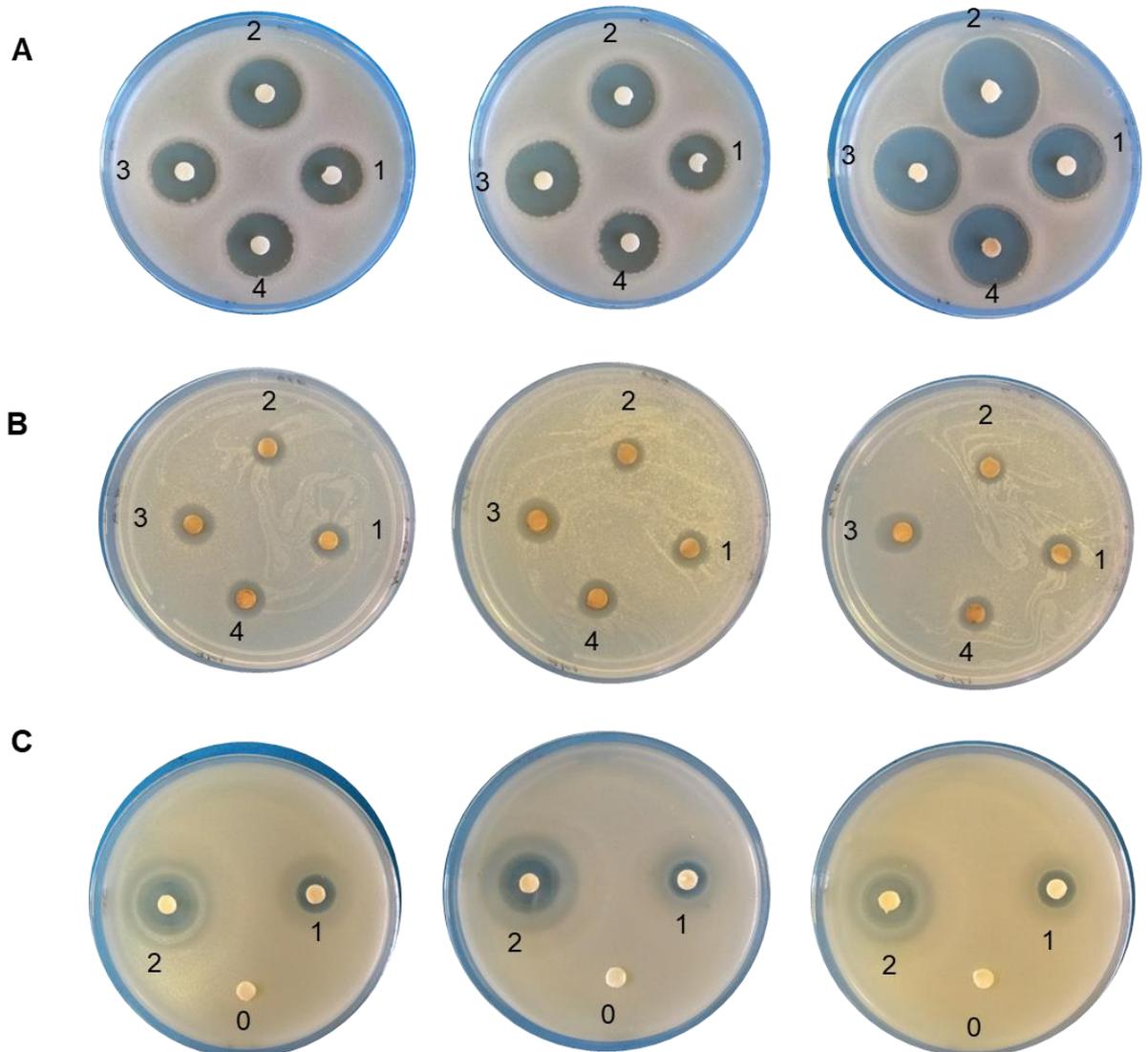
Apesar de as análises de caracterização indicarem que não houve a formação de NPMs nas combinações com cobre, estas foram as que apresentaram maior potencial bioativo. Sugerindo que a ação antimicrobiana nesses tratamentos foi promovida por outros fatores, não as CuNPs. No entanto, vale ressaltar que os melhores tratamentos testados, praticamente triplicaram o potencial de inibição em relação ao cobre puro, há exemplo o coentro  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com cobre 100 mM.

## **7.2. TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

Nos ensaios experimentais foi analisada a capacidade individual de formação de nanopartículas, controle das colônias bacterianas e determinação da melhor concentração de extratos e sais para a formação das nanopartículas.

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de Cu e Ag biossintetizadas a partir de extratos vegetais foi analisada baseado no halo de inibição.

Ao todo foram testados 846 tratamentos. Tomando como base a testemunha positiva estreptomicina a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Na análise final obteve-se 80 tratamentos mais eficientes que o antibiótico. Os extratos de coentro e boldo foram os que promoveram as melhores combinações com os sais de Cu e Ag respectivamente (figura 06).

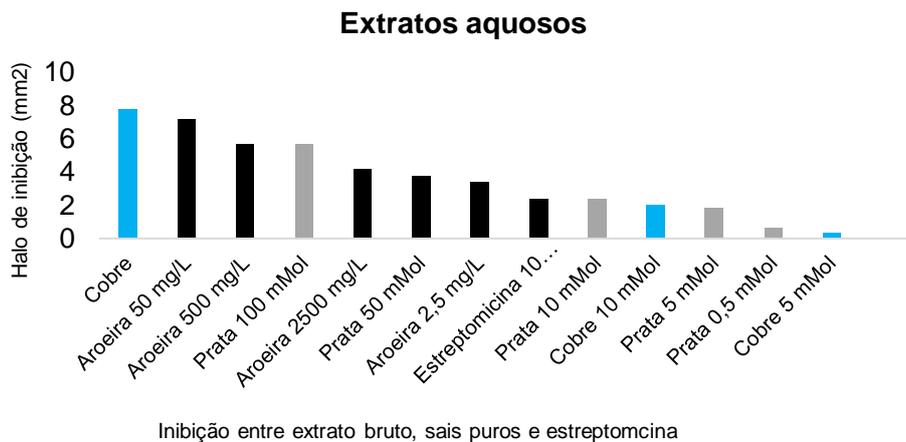


**Figura 06.** Cada número marcado nos bioensaios correspondem a uma concentração: (1A) Coentro  $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Cu  $100\text{mM}$ ; (2A) Coentro  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Cu  $100\text{mM}$ ; (3A) Coentro  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Cu  $100\text{mM}$ ; (4A) Coentro  $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Cu  $100\text{mM}$ . (1B) Boldo  $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Ag  $10\text{mM}$ ; (2B) Boldo  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Ag  $10\text{mM}$ ; (3B) Boldo  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Ag  $10\text{mM}$ ; (4B) Boldo  $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  + Ag  $10\text{mM}$ . (0C) Água; (1C) Estreptomicina  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (2C) Estreptomicina  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Dentre esses 80 tratamentos, 79 são composto apenas pelas combinações feitas entre extratos-sais, e somente uma por solução de Cu a 100 mM. Esse grupo é predominantemente integrado por combinações com Cu a 50 e 100 mM. Ressaltando que dentre os 20 extratos testados todos figuram nesse grupo em variadas concentrações (Ver tabela 01).

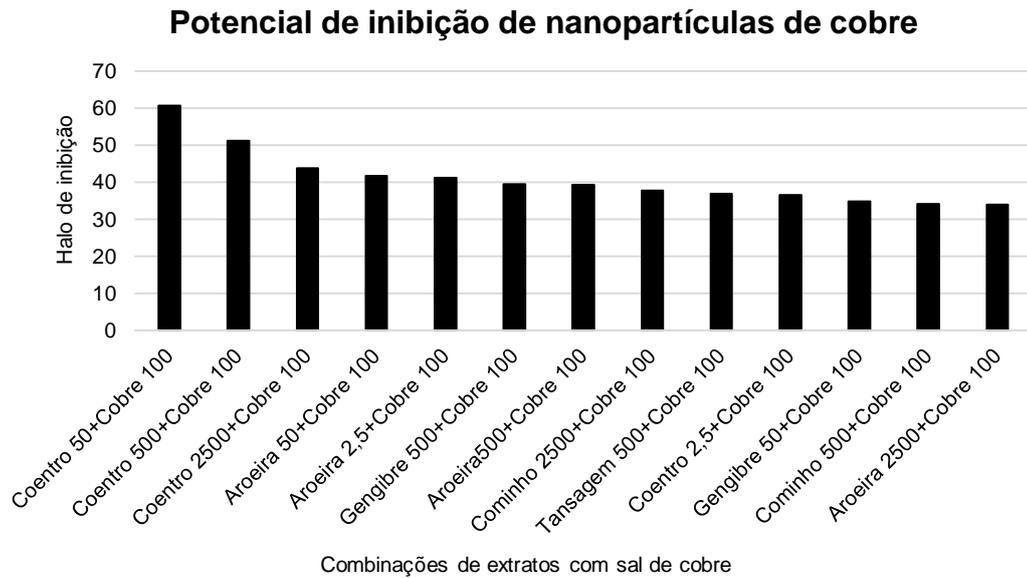
Entre as combinações feitas com Cu a atividade máxima sobre Xpm foi promovida pela junção de coentro 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com Cu 100 mM, com média de inibição de 60,63. A que menos inibiu Xpm foi mamão 2.500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com Cu 5mM, com média de 0,066. Entre as combinações com Ag a que mais inibiu a bactéria foi boldo 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com Ag 10 mM, a que apresentou menor ação foi mamão 2.500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com Ag 10 mM com média de 10,43 e 0,066.

Os extratos vegetais aquosos brutos também foram testados. Dos 20 tipos experimentados somente o extrato de aroeira em suas quatro concentrações exerceu uma baixa bioatividade sobre Xpm (figura 07).



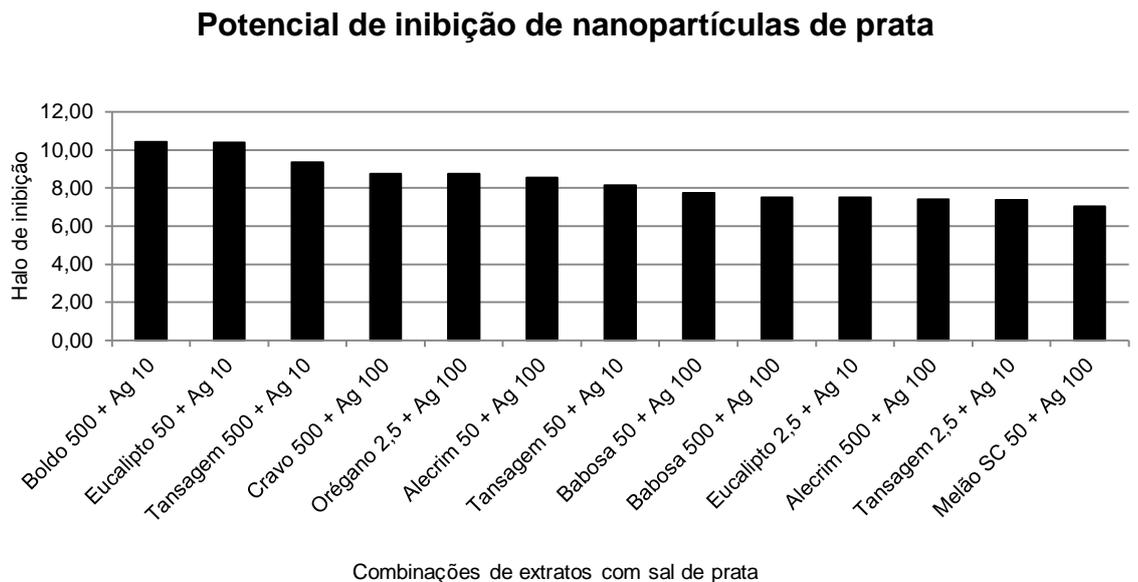
**Figura 07.** Inibição promovida pelos extratos aquosos brutos, estreptomcicina e sais de cobre e prata puro. Destaque para o extrato de aroeira, único extrato bruto a promover alguma inibição sobre Xpm.

No teste de sensibilidade a antimicrobianos os extratos que mais se destacaram na combinação com Cu para a formação das nanopartículas foram coentro, aroeira, gengibre, cominho e tansagem. Essas combinações apresentaram um elevado potencial para inibir o crescimento bacteriano de Xpm (figura 08).



**Figura 08.** 13 melhores combinações no ranking geral que apresentaram maior potencial de inibição de Xpm.

Para os tratamentos com prata, no teste de sensibilidade a antimicrobianos os extratos que mais se destacaram para a formação das nanopartículas, foram boldo, eucalipto, tansagem, cravo, orégano, alecrim, babosa e melão São Caetano. Essas combinações foram as que mais promoveram inibição do crescimento bacteriano de Xpm (figura 09).



**Figura 09.** 13 melhores combinações com prata que apresentaram maior potencial de inibição de Xpm.

### 7.3. MELHORES TRATAMENTOS ORIGINAIS X ESTIMADOS

Baseado na análise inicial, as melhores combinações originais foram testadas contra as concentrações estimadas. As concentrações estimadas foram obtidas pela análise dos gráficos gerados no SigmaPlot (v.11.0).

A análise estatística dos resultados iniciais obtidos com a montagem dos antibiogramas mostram que dentre todos os tratamentos testados os que eram advindos dos extratos de coentro, aroeira, cominho, gengibre, tansagem, alecrim e eucalipto combinadas com o sulfato de cobre a 100 mM, foram os que apresentaram maior potencial inibição do crescimento de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. A tabela a seguir informa os 17 melhores tratamentos provenientes das combinações dos extratos com o cobre, também os valores para estreptomicina a 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e Cobre a 100 mM (tabela 02).

**Tabela 02.** Combinações com Cu com maior potencial bioativo – Tratamentos originais.

Extrato	Conc.Extrato (µg.mL)	Sal	Conc. (mMol)	%Inib. Estrept	Scott-Knott
Coentro	50	Cobre	100	59	A
Coentro	500	Cobre	100	49,4	B
Coentro	2500	Cobre	100	42,1	C
Aroeira	50	Cobre	100	41,9	C
Aroeira	2,5	Cobre	100	41,4	C
Aroeira	500	Cobre	100	39,4	C
Cominho	2500	Cobre	100	37,9	C
Gengibre	500	Cobre	100	37,9	C
Tansagem	500	Cobre	100	36,0	D
Coentro	2,5	Cobre	100	34,9	D
Cominho	500	Cobre	100	34,1	D
Aroeira	2500	Cobre	100	34,1	D
Gengibre	50	Cobre	100	33,2	D
Alecrim	50	Cobre	100	31,8	E
Tansagem	50	Cobre	100	30	E
Alecrim	500	Cobre	100	29,4	E
Eucalipto	2500	Cobre	100	29,2	E
		Cobre	100	21,5	F
Estreptomicina	1000			12,3	H

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott).

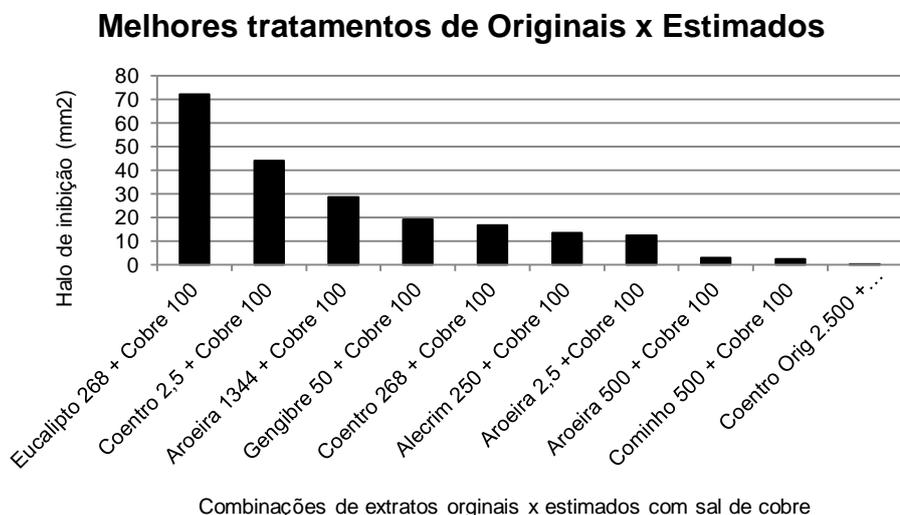
Em função de não ter apresentado um elevado potencial de inibição em relação ao cobre, as combinações com prata e os extratos brutos não foram utilizadas na realização dos ensaios de comparação entre originais e estimadas.

Os dados de inibição obtidos para as diferentes combinações foram avaliados por meio de análises de superfície de resposta e superfície de contorno, com o objetivo de estimar por meio de regressão, as prováveis melhores combinações entre extratos e sais metálicos capazes de promover a maior inibição *in vitro*. Os gráficos de superfície de resposta e superfície de contorno foram gerados com auxílio do software SigmaPlot (v.11.0). A partir da interpretação desses gráficos foram obtidos os seguintes dados de concentrações ótimas estimadas (tabela 03).

**Tabela 03.** Concentrações ótimas estimadas para os melhores extratos.

SAL	Conc. Sal (mM)	Extrato	Conc. Extrato ( $\mu\text{g.mL}$ )
Cobre	100	Coentro	268
Cobre	100	Aroeira	1344
Cobre	52	Cominho	241
Cobre	100	Gengibre	268
Cobre	52	Tansagem	268
Cobre	100	Alecrim	250
Cobre	100	Eucalipto	268

Nesse experimento para determinação da concentração ótima e qual extrato promovia maior formação de NPs e inibição, foram testados ao todo 30 tratamentos, entre combinações de extratos-sal, solução de cobre puro e testemunhas. As 10 melhores concentrações originais e estimadas atingidas em relação à estreptomicina  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  estão representadas a seguir (figura 10).



**Figura 10.** Inibição de crescimento de *Xpm* com as melhores combinações de Originais x Estimadas.

Dos 30 tratamentos testados 10 apresentaram inibição superior a obtida por Estreptomicina 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Entre esses 10 os que mais promoveram a inibição do crescimento de *Xpm* exercendo maior biotividade foram: Eucalipto estimado a 268  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  que exerceu uma inibição de em torno de 72,17% do crescimento, coentro original 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , aroeira estimada 1344  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , gengibre original a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , coentro estimado a 268  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e alecrim estimado a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , esses tratamentos obtiveram inibição de 44,06%, 28,65%, 19,19%, 16,76% e 13,52% respectivamente.

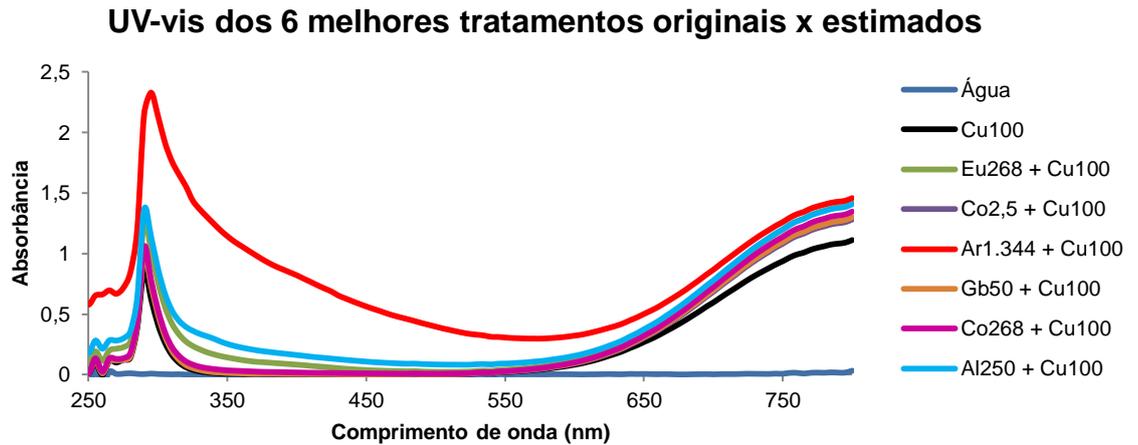
Em todos os ensaios da pesquisa os tratamentos a base do extrato de coentro em suas combinações apresentaram maior potencial bioativo. Indicando que esse extrato apresenta uma capacidade elevada para ativar o potencial antimicrobiano do cobre e promover inibição do crescimento bacteriano.

Nesse ranking dos 10 melhores tratamentos é observado que as combinações originais que em sua totalidade estão associadas ao cobre 100 mM são maioria. No entanto, ao observar as 5 primeiras colocações os tratamentos com as combinações ótimas estimados são maioria, indicando que todo o poder bactericida dos tratamentos inicialmente pode não ter sido testados, e que ainda é muito o que ser explorado nesse universo de combinações de extratos vegetais com sais metálicos para obtenção de nanopartículas.

### **7.3.1. UV-vis do ensaio de originais versus estimados**

Ao realizar a caracterização por espectroscopia UV-vis dos tratamentos de eucalipto estimado a 268  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , coentro original 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , aroeira estimada 1344  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , gengibre original a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , coentro estimado a 268  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e alecrim estimado a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  combinados com Cu 100 mM (figura 11). Observa-se que há semelhança com o perfil espectroscópico dos tratamentos de coentro e aroeira descritos anteriormente.

Esses foram melhores tratamentos obtidos no ensaio de originais versus estimados.



**Figura 11.** Perfil espectroscópico dos 6 melhores tratamentos obtidos pelo ensaio de originais versus estimados.

Conforme os perfis de coentro e aroeira já abordados, neste caso também sugere-se que os compostos orgânicos podem estar reagindo com os demais constituintes da fonte proveniente do cobre, principalmente o oxigênio (WANG et al., 2010; YALLAPPA et al., 2013). Já que é possível formar nanopartículas de óxido de cobre a partir do precursor sulfato de cobre (RANGEL, 2014).

Visto que nesta espectroscopia existe um pico de absorção na faixa de 300 nm. A partir desse espectro não há absorção, voltando a ressurgir a partir de 580 nm. A elevação da absorbância nessa faixa, pode estar relacionada com o aumento da quantidade de cobre no meio (FREITAS, 2019).

Nesse perfil ainda é possível verificar que na banda referente à aroeira, apresenta-se uma leve tendência de formação de um pico de absorção na faixa de 650 nm. No entanto, isso não se mantém, seguindo o espectro dos outros tratamentos a partir dessa faixa. O extrato de aroeira, em todas as etapas de experimento se mostrou como um dos melhores para combinar com os sais. É possível que essa tendência seja um indicio da formação de certa quantidade de CuNPs, mas não suficiente para ser detectada na caracterização e consideradas propriamente nanopartículas.

#### **7.4. DISCUSSÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

A capacidade redutora dos íons metálicos pelas plantas acredita-se estar relacionado com os aminoácidos, o ácido cítrico, os flavonoides, os compostos fenólicos, os terpenoides, as enzimas, o CO<sub>2</sub> intracelular, as proteínas de

membrana, os peptídeos, polissacarídeos, saponinas, ácido tânico, entre outros. Além da constituição outro fator determinante na síntese verde é a parte da planta de onde advém o extrato, pois cada parte podem produzir partículas com características distintas (AKHTAR, PANWAR e YUN, 2013). Essa variedade de constituintes está presentes nos extratos que apresentaram maiores potenciais redutores e bioativo.

Uma característica descrita na literatura que indica a possibilidade de uma espécie vegetal ser eficiente na redução de sais metálicos é a presença de antioxidantes. Essa propriedade além de atuar de forma eficaz na redução, também auxilia no revestimento externo das nanopartículas que eleva a estabilidade dos coloides metálicos produzidos (BEYENE et al., 2017).

Baseado nesse aspecto as plantas que apresentaram maior bioatividade sobre Xpm nos experimentos são ricas em antioxidantes. E em sua maioria possui alguma atividade antimicrobiana. A junção dessas propriedades se constitui como fatores determinantes quanto ao potencial de formação de NPs de Ag e ativação do Cu, bem como na ação antimicrobiana.

Dentre as plantas utilizadas para combinar com os sais de Cu e Ag para formação das NPs muitas são consideradas especiarias e existem inúmeras especiarias que exercem atividade antioxidante e antimicrobiana (HINNENURG, DORMAN e HILTUNEN, 2006). No entanto, essa atividade pode variar muito. Essa variação se dá por diferenças de composição química entre as ervas, especialmente com relação à presença de compostos antioxidantes. O emprego de diferentes processos de extração e época em que a planta é coletada, esse último é um dos fatores de maior importância, influenciam na quantidade dos constituintes ativos da planta (SCHWOB et al, 2004).

O extrato aquoso de coentro apresenta propriedade antioxidante. Essa habilidade de retardar a oxidação é atribuída aos seus constituintes fenólicos e aos carotenoides como derivados do ácido cafeico, flavonóides, terpenos e outras moléculas com igual atividade (MELO et al, 2003, (WANGENSTEEN, SAMUELSEN e MALTERUD, 2004). Pesquisadores portugueses também relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial de coentro sobre as bactérias gram-negativa *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al, 2011). Essa atividade pode estar ligada ao seu principal princípio ativo linalol (SHOBANA; NAIDU, 2000; SUHAJ, 2006).

Analisando os melhores tratamentos que foram à base coentro, aroeira, gengibre, cominho e tansagem. É verificado que em todos há uma variação na concentração do extrato, mas não no sal. Indicando a influencia dos extratos no potencial bioativo. Destaca-se que a melhor combinação; coentro  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com Cu 100 mM, não foi a mais alta testada, contudo a mais efetiva. No caso do coentro quanto mais aumentou a quantidade de extrato no meio, menos efetivo foi o efeito. Sugerindo que não existe necessariamente um efeito aditivo.

É possível que aumento da quantidade de metabolitos da planta no meio possa promover algum tipo de agregação e essa agregação pode ter impedido a formação das NPs, mas pode ter permitido liberar íons de cobre no meio. Esses compostos em excesso podem ajudar a formar agregados orgânicos e quelar o cobre. Se a quantidade desses compostos for baixa demais, não reduzirá o sulfato de cobre. E como não fica cobre livre dos demais constituintes, não forma as nanopartículas. Caso haja extrato demais e poucas moléculas de cobre pra ser reduzida, os compostos orgânicos reduziram tudo e depois por ainda estar reativo no meio, voltará agregando as moléculas, formando algum tipo de partículas maiores.

Sobre esse aspecto é possível aferir que para uma formação e ação mais eficientes das nanopartículas não se considera o efeito aditivo (+ extrato e + sal). Pelo contrario quando o meio apresenta uma quantidade de extrato e sal que não favoreça a formação das nanopartículas a tendência é que inicie o processo de redução, mas em decorrência desse desequilíbrio de substancias e reação dos grupos químicos os íons podem voltar a se agregar novamente (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992) não exercendo efeito efetivo sobre o microrganismo.

Sobre a capacidade bioativa da aroeira estudos demonstram que essa planta possui elevada atividade como sequestradoras de radicais livres. Isso porque a casca de aroeira possui diversas classes de metabólitos secundários, como taninos, saponinas, flavonoides e terpenos (HERINGER et al., 2007; BENDAOUD et al., 2010; PAWLOWSKI et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

Os extratos também foram testados separadamente sem a combinação com os sais de Cu e Ag. E dentre os 20 extratos testados somente aroeira apresentou alguma ação antibacteriana sobre Xpm. Essa atividade pode estar relacionada com as diversas substâncias presentes no extrato de aroeira que

apresentam atividade antimicrobiana, como a terebinthona, o ácido hidroximasticadienóico, o ácido terebinthifólico e o ácido ursólico (MARTINEZ, 1996).

Assim como aroeira o gengibre também apresenta propriedades antioxidantes devido a presença de compostos flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, carotenóides e compostos fenólicos. Os principais ácidos fenólicos presentes no gengibre são ácido salicílico, cafeico, gálico e ferúlico que são os responsáveis pelas propriedades antioxidantes (BEAL, 2006).

Alguns desses compostos presentes em mais abundância no gengibre o que atua como antioxidante e antimicrobiano é o geraniol (SINGH et al, 2008 MESOMO et al, 2013, MAJOLO et al, 2014),  $\alpha$ -curcumeno, geraniol e canfeno (MESOMO et al, 2013, MAJOLO et al, 2014, neral, 1,8-cineol (MAJOLO et al, 2014) e zingerona (SHOBANA; NAIDU, 2000; SUHAJ, 2006).

Sobre o cominho a literatura apresenta ampla evidência para as atividades biológicas e biomédicas do cominho, essas propriedades são usualmente atribuídas ao seu conteúdo e ação de seus constituintes ativos, como terpenos, fenóis, alcalóides e flavonóides (MNIF e AIFA 2015). O principal princípio ativo do cominho com capacidade antioxidante é o cuminaldeído (SHOBANA; NAIDU, 2000; SUHAJ, 2006). Na tansagem os principais constituintes químicos que confere a ela atividade antioxidante são os compostos fenólicos derivados do ácido 12 cafeico, os flavonóides, alcalóides, terpenos, e a vitamina C (POURMORAD, HOSSEINIMEHR, SHAHABIMAJD, 2006; SOURI, 2007, REINA 2013).

No eucalipto a capacidade antioxidante está relacionada com o conteúdo dos metabólitos secundários (BOOM et al, 2018). Nessa planta os metabólitos secundários constituem uma mistura complexa entre os hidrocarbonetos, compostos oxigenados. Nele há presença de muitos terpenos, dentre esses o princípio ativo mais abundante é o monoterpeno eucaliptol, mas também a intensa presença de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -Mirceno, Linalool,  $\alpha$ -terpineol (ALARCÓN, CONDE e MENDÉZ, 2019).

O extrato de mamão foi o que apresentou a menor capacidade de formação de NPMs e de inibição do crescimento de Xpm. Em estudo VIEIRA e colaboradores (2001), testou extrato de broto de mamão obtidos nos solventes de água, acetona e etanol sobre *E. coli* e *Staphylococcus aureus* e foi verificado que

os extratos da folha do mamoeiro não apresentaram atividade microbica. Em relação aos compostos antioxidantes o mamão apresenta esses compostos, no entanto, em abundancia eles estão localizados no fruto e não nas folhas que foi a fonte utilizada nesse trabalho.

O sal de cobre apresenta diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, agindo dentro e fora das células. Uma das características do cobre é a facilidade para aceitar ou doar elétrons, o que lhe confere uma elevada capacidade de oxidação e redução. Essa propriedade propicia que os íons de cobre alterem proteínas dentro das células, interferindo no funcionamento normal. O cobre também pode inibir o transporte eletrônico das interações que ocorrem na parede celular, essa interferência desordena as estruturas helicoidais do DNA.

De acordo com o exposto o cobre sozinho já apresenta uma capacidade alta de ação antimicrobiana sobre microrganismos. E nesse trabalho foi verificado que a associação do cobre permite que sua bioatividade seja ainda mais elevada. As caracterizações indicaram que não houve a formação, ou formação em baixa quantidade das nanopartículas. Contudo, as associações principalmente com o extrato de coentro permitiu que ação antimicrobiana do cobre praticamente triplicasse.

Uma possível explicação para esse fato é que a presença dos variados metabolitos dos extratos, principalmente aqueles que apresentaram maior potencial de inibição, propiciou que íons tóxicos de cobre ficassem livres no meio. Aumentando os íons livres, aumentou a bioatividade. Em estudo com a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* Lee et al., (1993), verificou que o efeito inibitório do cobre sobre bactéria era dependente da concentração de íons livres de cobre na solução.

As atividades antimicrobianas da maioria das nanopartículas esta associada a danos físicos causados a célula e também a liberação de íons tóxicos, os íons liberados pelas partículas quando penetram as células bacterianas, faz com as células se esforce para expulsa-los, nesse processo as células sofrem danos podendo danificar os constituintes celulares, como DNA, lipídios e proteínas, resultando em efeitos bactericidas (BILAL et al., 2017, STORZ e IMLAY,1999).

Ainda assim nesse experimento as nanopartículas de prata não apresentaram ação antimicrobiana elevada em relação ao cobre, esse fator pode

estar relacionado com as condições das plantas utilizadas para a obtenção dos extratos.

A ação antimicrobiana de AgNPs podem variar devido a fatores externos como estagio de desenvolvimento da planta utilizada, condição de preparo, idade das folhas utilizadas. Esses fatores influenciam no desempenho da biossíntese das NPs a exemplo disso Farooqui et al., (2010), avaliando a obtenção de AgNPMs a partir do extrato aquoso de *Clerodendrum inerme* sob diferentes condições. Verificaram que as NPMs obtidas com o extrato das folhas frescas apresentou maior rendimento em relação as obtidas a partir das folhas secas ao sol e no forno. As NPMs advindas das folhas frescas apresentaram tamanhos menores, e para a ação antimicrobiana ser mais efetiva quanto menor for a particular, maior sua bioatividade.

Um outro estudo que aponta que as folhas secas não foram eficientes na biossíntese de AgNPs é relatado por Tripathy et al., (2009), nesse trabalho foram testadas folhas de *Azadirachta indica*, secas a sombra em diferentes períodos para biossintetizar AgNPs. E constataram que o extrato preparado com folhas secas não produziu nenhuma banda de absorbância na faixa visível de 440 a 460 nm, confirmando a ineficiência das folhas secas na formação de nanopartículas.

Visto essas condições pode-se sugerir que a utilização de material vegetal seco diminui significativamente a atividade de redução de componentes presentes nos extrato. Não favorecendo a formação de AgNPMs o que consequentemente pode ter reduzido a bioatividade dos tratamentos a base de Ag sobre a bactéria Xpm.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O eixo central desse trabalho foi avaliar a capacidade de inibição da bactéria *Xanthomonas phaseoli pv. manihotis* e formação de nanopartículas de cobre e prata biossintetizadas a partir de extratos vegetais. Apesar de as caracterizações indicarem que nas combinações com cobre a formação de NPs não foi efetiva, essas foram as que apresentaram os maiores potenciais bioativo.

Essa bactéria é um patógeno que em condições favoráveis pode provoca elevadas perdas no cultivo da mandioca. As bactérias são microrganismos de reprodução rápida, essa característica também pode conferir a elas maior capacidade em desenvolver resistência aos bactericidas já conhecidos, por

pressão do ambiente. Ao levantar essa questão a busca por tecnologias que atuem no controle de microrganismos fitopatogênicos devem ser uma constante.

Nesse trabalho são apresentadas diversas possibilidades com potencial aplicação contra essa bactéria. Foi prospectada variadas plantas comumente utilizadas no consumo dos brasileiros e que apresentam potencial para a formação de nanopartículas e consequente ação antimicrobiana.

Dos extratos avaliados destaque-se o coentro que em todos os ensaios, figurou entre os melhores extratos para biossíntese e consequente inibição do crescimento da bactéria. Além do coentro, a aroeira, gengibre, cominho, tansagem e eucalipto estimado foram os que exerceram maior controle do crescimento bacteriano de Xpm.

De modo geral todas as plantas testadas exibiram alguma capacidade bioativa quando combinada com os sais de cobre e prata. Com destaque para o sal de cobre, pois foi nessas combinações que maior ação bioativa foi expressa. O que não significa que o sal de prata também não possa exercer elevada atividade antimicrobiana sobre outros patógenos, ou até mesmo em combinações com outras plantas, em condições diferentes de extração, tempo de reação, junção com outras plantas, bem como concentrações diferentes.

A realização desse projeto amplia as possibilidades de utilização dessa tecnologia, principalmente voltada para o meio agrícola, visto que aqui no Brasil ainda não é recorrente a utilização desse meio para controle dos fitopatógenos incidentes no país.

Em acordo com os objetivos propostos os resultados alcançados com a realização desse trabalho são promissores, haja vista a quantidade de combinações que promoveram a biossíntese das nanopartículas e inibição *in vitro* do crescimento bacteriano de Xpm. Tendo em conta que são raros os estudos utilizando nanopartículas de prata e cobre no controle dessa bactéria o conhecimento produzido nesse trabalho contribui significativamente para esse cenário.

Esses resultados podem ser precursores de estudos futuros para a otimização do tratamento de plantas, elaboração de produtos com ação antibacteriana, fungicida, além de contribuição para uma agricultura que provoque menos impacto ao ambiente.

## REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. S.). Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591–602, 2013.
- ALARCÓN, M. E, T.; CONDE, C. G.; MÉNDEZ, G. L. Extraction, description and antioxidant activity of essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 52, n. 1, p. 266, 2019.
- BAKER, S.; RAKSHITH, D.; KAVITHA, K. S.; SANTOSH, P., KAVITHA, H. U.; RAO, Y.; SATISH, S. Plants: Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. **Bioimpacts**, v. 3, n. 3, p. 111-7, 2013.
- BALLOTTIN, D. P. M. **Caracterização de nanopartículas de rata e sua aplicação na produção de tecidos antimicrobianos**. Tese de doutorado em Ciências – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 235, 2014.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK. M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **THE American Journal of Clinical Pathology**, Vol. 45, n. 4, 1966.
- BEAL, B.H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)**. Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 87, 2006.
- BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 466- 472, 2010.
- BEYENE, H.D. et al Hayelom Dargo Beyene, Adhena Ayaliew Werkneh, Hailemariam Kassa Bezabh, Tekilt Gebregergs Ambaye. Synthesis paradigm and

applications of silver nanoparticles (agnps), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v.13, p.18-23, 2017.

BILAL, M.; RASHEED, T.; IQBAL, M. N. H.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 554–574, 2017.

BOOM, E. A.; OROZCO, J. A.; ALEAN, J. D.; ROJANO, B. Evaluation of Antioxidant Activity of Eucalyptus Essential Oils Grown in Colombia. **Información Tecnológica**, v.29, n.6, 2018.

BONATTO, C. C., SILVA; L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**. v. 58, p. 46-54, 2014.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CHETTY, C.C.; ROSSIN, C.B.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H.; REY, M.E. Empowering biotechnology in southern Africa: establishment of a robust transformation platform for the production of transgenic industry-preferred cassava. **New Biotechnology**, v. 30, p. 136–143, 2013.

DURÁN, N.; PRISCYLA, D.; MARCATO, O. L. A., SOUZA, G. I. H., ESPÓSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains". **Journal Nanobiotechnol**, v. 3, n. 8, 2005.

ELTZ, F. Z. **Filmes de PAH/PAA com Nanopartículas Metálicas para a Desinfecção de Efluentes Industriais**. Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, p. 101, 2017.

FAROOQUI, M. A.; SINGH CHAUHAN, PRAKASH.; KRISHNAMOORTHY, P.; SHAIK, J. Extraction of silver nanoparticles from the leaf extracts of *Clerodendrum inerme*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 2010.

FERREIRA FILHO, J. R.; SILVEIRA, H. F.; MACEDO, J. J. G.; LIMA, M. B.; CARDOSO, C. E. L (2013). Cultivo, processamento e uso da mandioca: instruções práticas. **Embrapa**, Brasília – DF.

FREITAS, I. **Síntese Verde para obtenção de Nanopartículas de Prata a partir de Extratos Naturais**. Monografia, Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 60p. 2019.

HANDA S. S.; HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. **Trieste**: ICS Unido. 2008.

HERINGER, A. P.; SILVA, V. P.; OLIVEIRA, R. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Flavonóides de cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi por cromatografia por exclusão. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia. **Anais**, Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

HINNEBURG, I.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 122-129, 2006.

INGALE, S. V.; UMAMAHESWARA SASTRY, P.; WAGH, P. B.; TRIPATHI, A. K.; TEWARI, R.; JAYAKRISHNAN, V. B.; GUPTA, S. C. Preparation of Nano-Structured RDX in a Silica Xerogel Matrix. **Propellants, Explosives, Pyrotechnics**, v. 38, n. 4, p. 515–519, 2013.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**. v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011.

IULIANELLI, G. C. V.; TAVARES, M. I. B (2011). Caracterização de diferentes amostras de mandioca por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. **Polímeros**, v.21, n.2, p.131-136.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

KAMAT, P. V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticle. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, p. 7729-7744, 2002.

LEE, Y.A., SCHROTH, M.N., HEDSON, M., LINDOW, S.E., WANG, X.L., ONSON, B., BUCHNER, R.P. & TEVIOTDALE, B. Increased toxicity of iron-emended copper-containing bactericides to the walnut blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. **Phytopathology**, v. 83, p. 1460-1465, 1993.

MAJOLO, C.; NASCIMENTO, V.P.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M. Antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* rhizomes against enteric Salmonella isolated from chicken. **Rev. bras. plantas med.** vol.16, n. 3, 2014.

MARTINEZ, M.J., *et al.* Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**. V.52, p.171-4, 1996.

MARCATO, P.D.; DURAN, M.; HUBER, S.; RAI, M.; MELO, P.S.; ALVES, O.L., DURAN, N. Biogenic silver nanoparticles and its antifungal activity as a new topical transungual drug delivery. **J. Nano Res**, v. 20, p. 99-107. 2012.

MASSOLA, N. S. J. & BEDENDO, I. P. Doenças da Mandioca (*Manihot esculenta*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.;

CAMARGO, L. E. A (2005). (Ed.). **Manual de Fitopatologia. V. 2 Doenças das plantas cultivadas**. 4 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, p. 449-450.

MEDDA, S., HAJRA, A., DEY, U., BOSE, P., MONDAL, N. K. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Aloe vera* leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus sp.* and *Aspergillus sp.* **Appl Nanosci**, v. 5, p. 875–880, 2015.

MELO, E. A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B.; MACIEL, G. R. Antioxidant activity of coriander extracts (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, vol. 23, 2003.

MESOMO, M.C. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale*R.):Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.80, p.44 - 49, 2013.

MNIF, S.; AIFA ,S. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) from traditional uses to potential biomedical applications. **CHEMISTRY & BIODIVERSITY**, v.12, n. 5, p. 733-42, 2015.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346-536, 2013.

MOCK, J. J.; BARBIC, M.; SMITH, D. R.; SCHLITZ, S. Shape effects in *plasmon* resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **Journal of Chemical Physical**, v. 116, p. 6755-6760, 2002.

MOSES, E.; ASAFU-AGYEI, J. N.; ADUBOFOUR, K.; ADUSEI, A. Guide to Identification and Control of Cassava Diseases. **CSIR-Crops Research Institute**. Kumasi Ghana, 41 p, 2007.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 169, n. 2, p. 59-79, 2011.

NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. **Journal of Physical Chemistry**, v. 111, p. 3806- 3819, 2007.

PAWLOWSKI, Â.; SOARES, E.; PAWLOWSKI, C. A.; SOARES, E. B.; KALTCHUK-SANTOS, G. L. G.; ZINI, G. L. G.; CARAMÃO, G. L. G. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, v. 80, p. 96-103, 2012.

POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.11, p.1-4, 10 abr. 2006.

RAHMAN, A.; ISMAIL, A.; JUMBIANTI, D.; MAGDALENA, S.; SUDRAJAT, H. Synthesis of copper oxide nanoparticles by using *Phormidium cyanobacterium*. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 355 - 360, 2009.

RANGEL, W. M. **Síntese de Nanopartículas de Óxido de Cobre (II) Pelo Método de Coprecipitação**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 83, 2014.

REINA, Elaine et al. The Effects of *Plantago major* on the Activation of the Neutrophil Respiratory Burst. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 3, n. 4, p.268-272, out. 2013.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J. M.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 735, 2004.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHENDE, S. S.; GAIKWAD, N. D. BANSOD, S. D. Synthesis and evaluation of antimicrobial potential of copper nanoparticle against agriculturally important Phytopathogens. **International Journal of Biology Research**, v. 1, n. 4; p. 41-47, 2016.

SHOBANA, S.; NAIDU, K. A. Antioxidant activity of selected indian spices. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 62, n. 2, p. 107–110, 2000.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Med Microbiol**, v. 60, n. 10, p. 1479-1486, 2011.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P.; SINGH, P.; HELUANI, C. S. LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.295 - 302, 2008.

SOUZA, E.; SILVA, M.; SILVA, S. (2012) A cadeia produtiva da mandiocultura no vale do Jequitinhonha (MG): Uma análise dos aspectos sócio produtivos, culturais e da geração de renda para a Agricultura familiar. **Revista: ISEGORIA, Ação Coletiva em Revista**. Ano 1, vol. 1, n. 2, set. de 2011/fev. de 2012.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 188–194, 1999.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 531–537, 2006.

SUNDIN, G. W.; CASTIBLANCO, L. F.; YUAN, X.; ZENG, Q., YANG, C. H. Bacterial disease management: challenges, experienceinnovation and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v.17, n. 9, p. 1506–1518, 2016.

TRIPATHY, A.; RAICHUR, A. M.; CHANDRASEKARAN, N.; PRATHNA, T. C.; MUKHERJEE, A. Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 1, p. 237-246, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; GONÇALVES, F. A.; MENEZES, F. G.; ARAGÃO, J. S. SOUSA, O. V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*psidium guajava* linn. And *carica papayalinn.*) Upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n.3, 2001.

WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B; MALTERUD, K.E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chem**, v. 88, p. 293–297, 2004.

WANG, T. C.; RUBNER, M. F.; COHEN, R. E. Polyelectrolyte Multilayer Nanoreactors for Preparing Silver Nanoparticle Composites: Controlling Metal Concentration and Nanoparticle Size. **Langmuir**, v. 18, p. 3370-3375, 2002.

WANG, Y.; BIRADAR, A. V.; WANG, G.; SHARMA, K. K.; DUNCAN, C. T.; RANGAN, S.; ASEFA, T. Controlled Synthesis of Water-Dispersible Faceted Crystalline Copper Nanoparticles and Their Catalytic Properties. **Chemistry – A European Journal**, v. 16, p. 10735- 10743, 2010.

YALLAPPA, S.; MANJANNA, J.; SINDHE, M. A.; SATYANARAYAN, N. D.; PRAMOD, S. N.; NAGARAJA, K. Microwave assisted rapid synthesis and biological evaluation of stable copper nanoparticles using *T. arjuna* bark extract. **Spectrochimica Acta A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.110, p. 108–115, 2013.

## ANEXOS

## Anexo 01 – Tabela

Essa tabela mostra os 80 melhores tratamentos a partir da estreptomicina 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$  dentre os 846 tratamentos. Esses foram os que apresentaram maior potencial para inibir o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Tabela 01. 80 melhores combinações com maior potencial bioativo sobre Xpm.

Extrato	Conc.Extrato		Conc. Sal (mMol)	Média	
	(mg/L <sup>-1</sup> )	Sal			
Coentro	50	Cobre	100	60,63	A
Coentro	500	Cobre	100	51,10	B
Coentro	2500	Cobre	100	43,80	C
Aroeira	50	Cobre	100	41,80	C
Aroeira	2,5	Cobre	100	41,27	C
Gengibre	500	Cobre	100	39,53	D
Aroeira	500	Cobre	100	39,33	D
Cominho	2500	Cobre	100	37,83	D
Tansagem	500	Cobre	100	36,93	E
Coentro	2,5	Cobre	100	36,53	E
Gengibre	50	Cobre	100	34,90	E
Cominho	500	Cobre	100	34,07	E
Aroeira	2500	Cobre	100	34,00	E
Alecrim	50	Cobre	100	31,73	F
Tansagem	50	Cobre	100	30,93	F
Alho	50	Cobre	100	29,43	G
Alecrim	500	Cobre	100	29,33	G
Eucalipto	2500	Cobre	100	29,10	G
Cavalinha	500	Cobre	100	27,47	G
Boldo	2,5	Cobre	100	27,10	G
Tansagem	2,5	Cobre	100	27,00	G
Boldo	2500	Cobre	100	26,83	G
Barbatimão	2500	Cobre	100	26,70	G
Tansagem	2500	Cobre	100	26,27	G
Boldo 25	500	Cobre	100	26,03	G
Barbatimão	2,5	Cobre	100	25,80	G
Eucalipto	500	Cobre	100	25,03	G
Losna	2500	Cobre	100	25,03	G

Alho	2,5	Cobre	100	24,83	G
Barbatimão	50	Cobre	100	24,53	G
Cavalinha	2500	Cobre	100	24,40	G
Cavalinha	50	Cobre	100	24,33	G
Boldo	50	Cobre	100	23,17	H
Alho	2500	Cobre	100	22,07	H
Babosa	2,5	Cobre	100	21,60	H
Cobre	100			21,55	H
Mamona	2500	Cobre	100	21,50	H
Cominho	50	Cobre	100	21,40	H
Eucalipto	50	Cobre	100	21,20	H
Mamão	2500	Cobre	100	21,00	H
Mamão	500	Cobre	100	19,47	I
Barbatimão	500	Cobre	100	19,30	I
Alho	500	Cobre	100	19,20	I
Cominho	2,5	Cobre	100	19,07	I
Cravo	2500	Cobre	100	18,50	I
Alecrim	2500	Cobre	100	18,27	I
Tomilho	500	Cobre	100	17,97	I
Losna	500	Cobre	100	17,50	I
Neem	2500	Cobre	100	17,07	I
Orégano	50	Cobre	100	16,97	I
Alecrim	2,5	Cobre	100	16,63	J
Coentro	500	Cobre	50	16,13	J
Orégano	2500	Cobre	100	15,97	J
Losna	2,5	Cobre	100	15,90	J
Cravo	50	Cobre	100	15,63	J
Eucalipto	2,5	Cobre	100	15,63	J
Babosa	2500	Cobre	100	15,50	J
Cravo	500	Cobre	100	15,50	J
Neem	50	Cobre	100	15,37	J
Neem	2,5	Cobre	100	14,83	J
Neem	500	Cobre	100	14,53	J
Cravo	2,5	Cobre	100	14,50	J
Coentro	50	Cobre	50	14,43	J
Losna	50	Cobre	100	13,63	K
Cavalinha	2,5	Cobre	100	13,57	K
Cravo	500	Cobre	50	13,03	K
Tomilho	2,5	Cobre	100	13,00	K
Coentro	2500	Cobre	50	12,87	K

Babosa	500	Cobre	100	12,80	K
Tomilho 70	2500	Cobre	100	12,60	K
Tansagem	500	Cobre	50	12,40	K
Gengibre	2,5	Cobre	100	12,37	K
Tomilho	50	Cobre	100	12,30	K
Gengibre	2500	Cobre	100	12,13	K
Orégano	2,5	Cobre	100	12,13	K
Orégano	500	Cobre	100	12,13	K
Melão SC	50	Cobre	100	12,00	K
Babosa	50	Cobre	100	11,90	K
Melão SC	500	Cobre	100	11,90	K
Mamona 80	2,5	Cobre	100	11,40	K
Estreptomicina	1000			11,09	K

---

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott).