



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Efeito de Nanopartículas de Cobre, Prata e Azoxistrobina
sobre a Mancha Parda do Arroz**

Felipe Araujo Sousa

Recife – PE

2021

Felipe Araujo Sousa

**Efeito de Nanopartículas de Cobre, Prata e Azoxistrobina
sobre a Mancha Parda do Arroz**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

Coorientador: Prof. Dra. Thaís Ribeiro Santiago

**RECIFE-PE
JULHO – 2021**

Efeito de Nanopartículas de Cobre, Prata e Azoxistrobina sobre a Mancha Parda do Arroz

FELIPE ARAUJO SOUSA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 05/07/2021

ORIENTADOR(A):



Prof. Dr. Jonas Alberto Rios

EXAMINADORES:



Prof. Dr. André Ângelo Medeiros Gomes



Prof. Dr. Alessandro Nicoli

RECIFE-PE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725e Sousa, Felipe
 Efeito de Nanopartículas de Cobre, Prata e Azoxistrobina sobre a Mancha Parda do Arroz / Felipe Sousa. - 2021.
 52 f. : il.

 Orientador: Jonas Alberto Rios.
 Coorientador: Thais Ribeiro Santiago.
 Inclui referências.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
 Recife, 2021.

 1. arroz. 2. mancha parda. 3. nanopartículas. 4. resistência genética. I. Rios, Jonas Alberto, orient. II. Santiago,
 Thais Ribeiro, coorient. III. Título

CDD 632

*Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, **Francisco Moadi de Sousa e Francisca Juranir Araujo Sousa**, por todo amor, carinho, dedicação e pelo apoio que tem me dado para a realização deste sonho. Nos momentos de cansaço, adversidades e ausência, a imagem, o sorriso, o amor incondicional, a compreensão, as orações, as palavras de incentivo o cuidado e o amor de vocês me fizeram continuar.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me amar e por permitir que eu tenha forças para lidar com as adversidades impostas, por me acolher nas horas mais difícil e por sempre ser esse pai presente em todo o trajeto da minha caminhada. E principalmente por me entender nas falhas, me dando a possibilidade de corrigi-las e assim possibilitando que eu seja uma pessoa melhor.

A nossa senhora Aparecida pela interseção ao seu filho Jesus por tantas vezes te pedi auxílio e fui atendido, porque sinto o teu amor maternal a me cuidar e a me amar.

Aos meus pais, Juranir e Moadi, pelo apoio e amor incondicional, por me ensinar a ser um cidadão de bem me mostrando sempre a importância da honestidade, da força de vontade, do amor ao próximo e os princípios norteadores da fé.

As minhas irmãs, Fernanda e Faheylyla presente de Deus em minha vida sempre tão próximas nas minhas aflições e alegrias, onde sempre encontro os melhores conselhos e animo necessário para seguir em frente.

Ao professor Dr. Jonas Alberto Rios pela valiosa orientação, pela paciência em ensinar, pelo o exemplo de ser humano que é, e por todo aprendizado ao longo desses dois anos de trabalho.

A professora Dra. Kamila câmara pelo incentivo de fazer a pós-graduação, pelos ensinamentos e por todas as lições de vida repassadas.

A professora Dra. Rosana Blawid, ao professor Dr. Humberson rocha, ao Professor Dr. Clístenes que disponibilizaram os seus laboratórios para o desenvolvimento do trabalho.

A professora Dra. Thaís Ribeiro Santiago, pelo preparo e envio das Nanopartículas de cobre e prata.

A todos os professores do mestrado em Fitopatologia, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu aprendizado.

Aos meus amigos do laboratório interação planta-patógeno, Larissa, Jadson, Cássia, Ailton, Evandro.

A Keyla por toda a ajudar nos experimentos, no apoio moral, pela confiança e principalmente pela boa convivência.

A todos vocês, muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO GERAL	11
A cultura do Arroz	11
A Mancha Parda do arroz	12
Uso de nanopartículas (NPs) na agricultura	14
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO II	23
Nanopartículas de Cobre e Prata reduzem a Mancha Parda em Folhas de Arroz	24
RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Testes <i>in vitro</i>	29
2.2. Experimentos <i>in vivo</i>	30
2.2.1 Crescimento de plantas e preparo da solução nutritiva	30
2.2.2 Pulverização dos tratamentos	30
2.2.3 Procedimento de Inoculação	31
2.2.4 Avaliação dos componentes de resistência a mancha parda	31
2.3 Análise Estatística	32
3. RESULTADOS	32
4. DISCUSSÃO	34
5. AGRADECIMENTOS	37
6. REFERÊNCIAS	38
TABELAS E FIGURAS	44
CAPÍTULO III	51
CONCLUSÕES GERAIS	52

RESUMO GERAL

Os cereais são uma importante fonte de alimento em todo o mundo, sendo destaque devido aos seus diferentes aspectos nutricionais. Particularmente o arroz destaca-se por apresentar uma fonte diária de carboidratos e proteínas. A mancha parda (MP), causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito e Kuribayashi)], causa grandes perdas em todas as regiões produtoras de arroz no mundo. Os principais sintomas causados por *B. oryzae* são observados principalmente nas folhas e nos grãos, porém podem ser observados na panícula e na bainha. Nas folhas podemos encontrar manchas ovais, de coloração marrom-avermelhada e, na grande maioria das vezes, um centro acinzentado. Nos grãos podemos ver as manchas de coloração marrom escuro ou marrom-avermelhado e que podem cobrir parcial ou totalmente a superfície dos grãos. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o efeito de Nanopartículas (NPs) de Prata e NPs de Cobre sobre esta doença. Primeiramente, testes *in vitro* foram realizados para verificar o crescimento de *B. oryzae* em placas de petri com doses crescentes de ambas NPs. Posteriormente um experimento *in vivo* foi instalado em condições de casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado em 10 repetições, sendo utilizadas as cultivares de arroz Pampeira, A702Cl e Tropical. Os tratamentos utilizados foram: água destilada (tratamento controle), fungicida Azoxystrobina, NPs de prata ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) e NPs de cobre ($5 \mu\text{L L}^{-1}$). A inoculação com *B.oryzae* foi realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos utilizando a concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} . Para todos os testes *in vitro*, os ajustes de regressão linear para o índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro micelial e número de conídios de *B. oryzae* demonstraram uma redução destes parâmetros a medida que as doses de NPs de prata e NPs de Cobre aumentaram. A área abaixo da curva de progresso da doença foi significativamente reduzida em 92, 31 e 33 % para Pampeira, 92, 25 e 57 % para A702Cl e 92, 33 e 58 % para Tropical, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata em comparação com o tratamento controle. Esta mesma tendência de redução foram observadas para os demais componentes de resistência como a severidade final, tamanho de lesão e número de lesões por cm^2 . Contudo, os resultados do presente estudo demonstraram a eficiência das NPs de cobre e, principalmente, NPs de prata no controle de MP do arroz.

Palavras -chave: Arroz, mancha parda, nanopartículas, resistência genética

GENERAL ABSTRACT

Cereals are an important food source around the world, being highlighted due to their different nutritional aspects. Rice in particular stands out for presenting a daily source of carbohydrates and proteins. Brown spot (BS), caused by the fungus caused by *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorph: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito and Kuribayashi)], causes great losses in all rice producing regions in the world. The main symptoms caused by *B. oryzae* are mainly observed in the leaves and grains, but they can be observed in the panicle and sheath. On the leaves we can find oval, reddish-brown spots and, in most cases, a grayish center. In grains we can see as dark brown or reddish-brown spots that may partially or completely cover the surface of the grains. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of Silver Nanoparticles (NPs) and Copper NPs on this disease. First, *in vitro* tests were carried out to verify the growth of *B. oryzae* in petri dishes with increasing doses of both NPs. Subsequently, an *in vivo* experiment was installed under greenhouse conditions in a completely randomized design with 10 replications, being used as rice cultivars Pampeira, A702Cl and Tropical. The procedures used were: distilled water (control treatment), Azoxystrobin fungicide, silver NPs ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) and copper NPs ($5 \mu\text{L L}^{-1}$). Inoculation with *B.oryzae* was carried out 24 hours after application of the treatments at a concentration of 1×10^5 conidia mL^{-1} . For all *in vitro* tests, linear regression adjustments for mycelial growth rate index, mycelial diameter and number of conidia of *B. oryzae* demonstrated a reduction in these parameters as the doses of silver NPs and copper NPs increased. An area under the disease progress curve was reduced by 92, 31 and 33% for Pampeira, 92, 25 and 57% for A702Cl and 92, 33 and 58% for Tropical, respectively, for treatments with azoxystrobin, NPs Copper and Silver NPs compared to control treatment. This downward trend was observed for the other resistance components such as final severity, lesion size and number of lesions per cm^2 . However, the results of the present study demonstrated an efficiency of copper NPs and, mainly, silver NPs in the BS control.

Keywords: Rice, brown spot, nanoparticles, genetic resistance

CAPÍTULO I

Introdução Geral

Efeito de Nanopartículas de Cobre, Prata e Azoxistrobina sobre a Mancha Parda do Arroz

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do Arroz

Os cereais são uma importante fonte de alimento em todo o mundo, sendo destaque devido aos seus diferentes aspectos nutricionais (FAO, 2019). Particularmente o arroz destaca-se por apresentar uma fonte diária de carboidratos e proteínas (KHUSH, 1997; FAO, 2019). O Brasil apresenta-se como um importante consumidor de arroz no mundo, sendo consumido por pessoas de todas as faixas sócio-econômicas (AZAMBUJA *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2015). Segundo a companhia nacional de abastecimento (CONAB), a produção em 2020 foi de 10,5 milhões de toneladas, um crescimento de 0,6% em relação a 2019. Os métodos de irrigação por inundação ou aspersão são os mais utilizados na cultura do arroz e esse sistema irrigado é utilizado em 73,5% da área destinada ao cultivo do arroz no Brasil e torna-se responsável por 90% da produção nacional (CONAB, 2020). Para as demais áreas produtivas é empregado arroz de terras altas ou sequeiro, onde a lavoura é praticada em áreas sem a influência de rios ou de lençóis freáticos e não se emprega irrigação. Portanto a necessidade hídrica da cultura é suprida apenas pela precipitação oriunda das chuvas (LORENÇONI, 2013).

O Rio Grande do Sul é considerado o principal estado produtor de arroz com cerca de 1,1 milhão de hectares (55,5%), onde o seu cultivo é realizado tradicionalmente em áreas irrigadas (CONAB, 2020). O arroz é um cereal que pertence a família das gramíneas e ao gênero *Oryza sativa L.*, é cultivado em regiões tropicais e temperadas, onde a luz e as chuvas são intensas (KHUSH, 1997). O arroz tem seu ciclo de desenvolvimento que pode variar entre 100 e 140 dias para a maioria das cultivares utilizadas no Rio Grande do Sul e Nordeste (SOSBAI, 2016). A planta pode ser morfológicamente caracterizada em órgão vegetativo (raízes, colmo e folha) e reprodutivo representado por flores e sementes (CHANG e BARDENAS, 1965).

O colmo é um suporte não ramificado subdividido em entrenós e nós. A região nodal dá sustentação a uma folha e um broto, com dimensões variadas ao longo da planta, onde os nós e entrenós da parte inferior tem maior diâmetro do que as partes superiores (EMBRAPA,

2010). As panículas são inflorescências, no qual estão localizadas sobre o último entrenó do caule. Estas possuem no seu interior a flor e o óvulo, tendo como principal função a reprodução da espécie formando o grão de arroz (EMBRAPA, 2010). O tempo de duração entre o período de formação e enchimento dos grãos varia entre 30 a 40 dias. Os grãos passam a ser caracterizados ao longo dos seu desenvolvimento como leitosos, pastosos e grãos em massa dura, até atingirem o período de maturação fisiológica. Comumente, a colheita mecanizada inicia quando o grão apresenta umidade de 22% (SANTOS, STONES e VIEIRA, 2006; SOSBAI, 2007).

A Mancha Parda do arroz

A mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Bredade Haan) shoemaker, é uma doença que afeta todo o ciclo de desenvolvimento da cultura e está presente em todas as regiões produtoras de arroz do mundo, especialmente nas regiões tropicais. Trata-se da segunda doença mais importante, sendo o principal patógeno causador de manchas, na cultura do arroz. O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoemaker (sin. *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subramanian & Jain), (Teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus*) pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (ROSSMAN et al., 2013). Esse fungo possui micélio cinza a cinza esverdeado escuro; conídios retos, raramente curvos, cilíndricos ou largos no centro e castanhos claros a dourados, a germinação frequentemente nas duas extremidades; conidióforos septados, isolados ou apresentando-e em pequenos grupos, reto ou flexível e septados (QUINTANA et al., 2017). Os grãos infectados apresentam aspecto manchado e de menor peso, afetando assim o rendimento e a qualidade (SOLO, 2009). É um patógeno responsável por causar sérios problemas na cultura do arroz, estando o mesmo distribuído em todas as regiões orizícolas do mundo (KUMARI et al., 2015)

Os sintomas gerado pela doença vão desde manchas enferrujadas em sementes, resultando na perda do potencial germinativo e na morte de plântulas, com consequente redução do estande (AMORIO; CUMAGUN, 2017), até manchas marrons escuras a avermelhada, com formato oval e distribuídas uniformemente sobre toda a superfície foliar das plantas, com redução da capacidade fotossintética e consequentemente na redução da produção (AMORIO; CUMAGUN, 2017; QUINTANA et al., 2017). Temperaturas em torno 25 a 28 °C e umidade alta são consideradas condições favoráveis para a infecção do fungo (CARDOSO e KIMATI, 1997). A sobrevivência de *B. oryzae* no campo ocorre em plantas

hospedeiras alternativas e em restos culturais por um período de dois a três anos. (CORRÊA, 2006). Plantas hospedeiras, restos culturais, juntamente com as sementes infectadas constituem uma importante fonte de inóculo da doença no campo, sendo os esporos deste patógeno dispersos pelo vento e água, em campos de produção de arroz (SCHWANCK, 2012).

Para o manejo da mancha parda em arroz são recomendada aplicação de fungicidas e o uso de cultivares resistentes (KORNDORFE *et al.*, 1995; CELMER *et al.*, 2007). Outras práticas de controle como o uso de sementes sadias, destruição de restos culturais e rotação de cultura ajudam no manejo da doença desfavorecendo a sobrevivência do patógeno, adicionalmente, a correta adubação e o manejo da água no manuseio da cultura contribuem para diminuir os efeitos da doença nas áreas (BEDENDO e PRABHU, 2016).

A aplicação de fungicidas na parte aérea tem apresentado como sendo uma medida de controle eficaz contra as doenças foliares do arroz, sendo que o nível desse controle depende do ingrediente ativo utilizado e da metodologia de aplicação empregada (BALARDIN, 1999). Alguns estudos têm mostrado que os maiores níveis e controle e, maiores produtividade, ocorrem quando se realizam aplicações de triazóis e estrobilurinas (OTTONI *et al.*, 2000; DALLAGNOL *et al.*, 2006; SILVA FILHO *et al.*, 2009). O tratamento químico em sementes tem se mostrado eficiente no controle desta doença, onde o fungicida previne ou reduz o inóculo inicial da cultura devido à sua ação sobre *B. oryzae*, onde é citado como o principal agente de efeito deletério na emergência e na formação da plântula na cultura do arroz (PRABHU e VIEIRA, 1989; MALAVOLTA *et al.*, 2002; VAN NGHIEP e GAUR, 2005; SOSBAI, 2010).

O controle biológico surge como um método promissor que vem apresentando bons resultados no controle da mancha parda. Abdel-Fattah *et al.* (2007), o uso de *Trichoderma harzianum* no biocontrole de *B. oryzae* em experimentos realizados em campo e *in vitro*. Ludwig *et al.* (2009) mencionou que na aplicação de isolados bacterianos para o controle da mancha parda, onde foi feito ensaios, no qual realizou-se a inoculação da parte aérea por microbiolização de sementes, houve redução significativa na severidade da doença de 74 e 86%.

O uso de silício (Sí) em plantas de arroz tem aumentando a resistência contra a brusone, mancha parda, podridão do colmo, escaldadura, queima das bainhas e escurecimento dos grãos (CACIQUE *et al.*, 2013; DATNOFF *et al.*, 1997; HAYASAKA *et al.*, 2008; KIM

et al., 2002; REZENDE *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2003A,B; SCHURT *et al.*, 2013; TATAGIBA *et al.*, 2014). ZANÃO JÚNIOR *et al.* (2009) relatou que a aplicação de silício via foliar reduziu significativamente a intensidade da mancha parda do arroz. Em resumo, este efeito tem sido associado a deposição desse elemento na parede celular e abaixo da cutícula, onde forma uma dupla camada cutícula-sílica na folha do arroz com a função de atuar como uma barreira física que impede ou atrasa a penetração dos fungos (HAYASAKA *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2002; MA e YAMAJI, 2006; YOSHIDA *et al.*, 1962). Por outro lado, o Si pode potencializar os mecanismos bioquímicos de defesa das plantas de arroz (RODRIGUES *et al.*, 2003B, 2004, 2005).

Uso de nanopartículas (NPs) na agricultura

Atualmente, o termo nanotecnologia refere-se ao estudo dos fenômenos e manipulação de estruturas em escala nanométricas (10^{-9} m = 1 nm) com dimensões que normalmente não exceda 100 nm (Sahoo *et al.*, 2007). Recentemente a Comissão da União Europeia propôs uma definição formal de nanomateriais como uma estrutura natural ou fabricada, agregada ou deslocada, com uma ou mais dimensões externas variando de 1 a 100 nm (EUROPEIA, 2012). As nanopartículas comumente são sintetizadas por meio de métodos físicos, químicos e biológicos, devido os métodos físicos e químicos requererem alto custo de energia, podem também envolver substâncias tóxicas. No entanto, tem sido intensificado o uso do método biológico, que pode ser realizado por meio de: utilização de bactérias; uso de fungos, processo denominado de micossíntese, como a utilidade de diversas espécies de *Fusarium* spp. para a biossíntese de nanopartículas metálicas; similarmente a síntese pode ser realizada por plantas, processo pelo qual é denominado de fitossíntese, como no caso do uso do mamão (*Carica papaya* L.) para a biossíntese de nanopartículas; além da utilização de cianobactérias e actinomicetos. Vale ressaltar que dentro da biossíntese verde são mais utilizadas as proteínas oriundas de fungos e plantas, que atuam como agentes de proteção e estabilização das nanopartículas sintetizadas (RAI, 2003).

Particularmente na agricultura, estas moléculas tem sido utilizados como nanofertilizantes, nanocidas ou pesticidas encapsulados que é transformado em NPs e comercializado para o uso de forma controlada (FURLANETO, 2011), apresentando bons resultados na melhoria da qualidade e no aumento da produtividade. A nanotecnologia tem contribuído de maneira promissora para o agronegócio e notoriamente nos últimos anos, houve um avanço nos estudos em relação a nanotecnologia na agricultura (DUHAN *et al.*,

2017). Entre suas aplicações, pode-se citar o desenvolvimento de sensores para detecção de pesticidas (WANG *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012), confecção de embalagens (ESPITIA *et al.*, 2012) e remediação de efluentes (NASSAR, 2013). É visto que a uma melhoria significativa do desempenho da economia de insumos, por meio do desenvolvimento de nanopartículas e nanoencapsulados, para liberação controlada de fertilizantes e pesticidas. Assim, podendo contribuir de forma significativa para o aumento da competitividade e desempenho dos processos desde o início da cadeia produtiva (MATTOSO e DURÁN *et al.*, 2005).

A aplicação da nanotecnologia em fitopatologia é relativamente recente quando comparada a área biomédica e as indústrias de tecnologia da informação, onde a nanotecnologia está amplamente utilizada na fabricação de novos materiais. Assim, inúmeras oportunidades podem ser exploradas, como o desenvolvimento de produtos com características bactericidas, fungicidas, nematocidas e viricidas e o desenvolvimento de sensores sensíveis e seletivos. Várias são as pesquisas que têm confirmado que NPs de metais é eficiente contra patógenos de plantas, insetos e pragas (CHOUDHURY *et al.*, 2010; RAI e INGLE, 2012). O uso de diferentes tipos de nanomateriais tais como as NPs, permitem o desenvolvimento de estratégias confiáveis visando o controle e detecção de fitopatógenos (ARDAKANI 2013; CHOWDAPPA e GOWDA, 2013; OCSOY *et al.*, 2013; CROMWELL *et al.*, 2014; KHIYAMI *et al.*, 2014; PRASAD, KUMAR e PRASAD, 2014; DENISON *et al.*, 2015; ELBESHEHY *et al.*, 2015; SERVIN *et al.*, 2015; ÁLVAREZ-LÓPEZ *et al.*, 2016). Atualmente, os nanomateriais mais comuns usados para controlar fungos são aqueles que contêm prata, zinco, carbono, cobre, manganês, sílica, alumínio ou quitosana (ÁLVAREZ-LÓPEZ *et al.*, 2016).

Entre os inúmeros tipos de metais que são usados na preparação de NPs, os metais de transição são os que ocasionam maior interesse, principalmente em virtude de suas propriedades catalíticas. A prata é o metal de transição mais estudados na literatura, especialmente com relação ao desenvolvimento de novas metodologias de preparação de nanopartículas e por ser um material tecnologicamente importante (FRATTINI *et al.*, 2005). A prata é um mineral extraído da natureza e possui uma ação anti-séptica conhecida desde as antigas civilizações. Estudos realizado na área da medicina têm demonstrado que a prata é eficiente contra mais de 650 organismos patogênicos, dispondo de um amplo espectro de atuação. Sua utilização na forma de NPs enriquece ainda mais sua propriedade, permitindo seu uso em uma ampla gama de aplicações (DASTJERDI *et al.*, 2009; YOON *et al.*, 2007). Em prévios estudos tem se verificado que as NPs de prata (Ag^+ NPs) exibem forte atividade

inibitória para fungos fitopatogênicos como *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker (1959) e *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr (1977) (JO *et al.*, 2009); *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (1892) (Kasprowicz *et al.*, 2010); *Colletotrichum* spp. (LAMSAL *et al.*, 2011); *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (1858), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (1884); *Botrytis cinerea* Pers. (1794) (KRISHNARAJ *et al.*, 2012); *Phytophthora* spp. (Ali *et al.*, 2015); e outros fungos e oomicetos. Embora os mecanismos definitivos de ação de NPs de prata contra fungos não estejam totalmente elucidados, existem muitas propostas confiáveis para a atividade antimicrobiana de prata como a inibição da respiração celular, inativação de enzimas, distúrbios da função de proteínas e a interação com o fósforo em moléculas de DNA levando ao comprometimento da replicação celular (PRATHNA *et al.*, 2011; SERVIN *et al.*, 2015). Aparentemente, íons Ag^+ e NPs de prata têm modos de ação semelhantes, mas há um aumento na atividade antimicrobiana de NPs de prata devido principalmente ao aumento na quantidade de Ag^+ liberado para as células. Ali *et al.* (2015) avaliaram o impacto de NPs de prata sintetizados com o extrato de *Artemisia absinthium* L. e observou que tais NPs inibiram o crescimento micelial, germinação de zoósporos, alongamento do tubo germinativo e produção de zoósporos de sete espécies do gênero *Phytophthora* spp. abaixo de $10 \mu\text{g} / \text{mL}$. Da mesma forma, Lamsal *et al.* (2011) usou observações microscópicas para mostrar que NPs de prata com tamanhos entre 4-8 nm inibiram o crescimento de fungos hifas e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. em comparação com o controle.

NPs à base de cobre tem sido sintetizadas desde o início de 1990 (LISIECKI *et al.*, 1993; QI *et al.*, 1997). Estas surgiram como uma nova classe de antimicrobianos com potencial contra uma variedade de patógenos (GAWANDE *et al.*, 2016; RAI, *et al.*, 2018), incluindo aqueles que desenvolveram resistência aos produtos químicos (CHOWDHURY *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2009). No entanto, o exato mecanismo de ação de NPs de cobre ainda não é completamente compreendido. Uma das teorias mais predominantes é que NPs à base de cobre danificam a membrana celular, alterando sua permeabilidade, causando assim morte celular (RAI *et al.*, 2018; CHATTERJEE *et al.*, 2014; YADAV *et al.*, 2017). Outro mecanismo hipotético refere-se ao dano celular oxidativo devido à peroxidação lipídica e degradação do DNA pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (MAHMOODI *et al.*, 2018; CHATTERJEE *et al.*, 2014). Também é possível que os NPs interfiram em processos bioquímicos essenciais, como o DNA replicação pela absorção de seus íons metálicos (MAHMOODI *et al.*, 2018; CHATTERJEE *et al.*, 2014; YADAY *et al.*, 2017). Assim,

recentes estudos indicam que as NPs de cobre atua pela combinação de diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais do patógeno, associado a inibição da expressão gênica de fatores de virulência no patógeno (CHEN *et al.*, 2019; YADAY *et al.*, 2017). Na proteção de plantas, NPs de cobre têm demonstrado eficácia contra *Fusarium* sp., *Phoma destructiva*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* e *Rhizoctonia solani* (PARIONA *et al.*, 2019). Além disso, nanopartículas de cobre de várias dimensões (11-14 nm) e formas químicas (ex.: Cu₂O, CuO) que foram relatadas para controlar *Phytophthora infestans*, com menores quantidades do que os produtos registrados à base de cobre (35–224 g / hl) (GIANNOUSE, AVRAMIDIS e DENDRINOUSAMARA, 2013). Há poucos estudos que indicam o efeito biocida de NPs de cobre contra fitopatógenos de bactérias, como *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. As nanopartículas de prata demonstram amplo espectro de ação contra bactérias, em especial as *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), *Escherichia coli* (Migula) e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroter.); e fungos, como *Candida albicans* (Robin) Berkhout; são altamente eficazes como agentes antivirais (RAI, 2003).

Considerando a necessidade de se utilizar produtos alternativos durante o controle de doenças, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da aplicação preventiva de NPs de prata e NPs cobre sobre a mancha parda do arroz.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G. M.; SHABANA, Y. M.; ISMAIL, A. E.; RASHAD, Y. M. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*, **Mycopathologia**, Den Haag, v.164, p. 81–89, 2007.
- ÁLVAREZ-LÓPEZ, V., PRIETO-FERNÁNDEZ, Á., CABELLO-CONEJO, M. I., e KIDD, P. S. Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. **Science of the total environment**, v. 548, p. 370-379, 2016.
- ALI, G. S., E.D. A. S., PATEL, J. S., GREEN, K. B., ALI, M., BRENNAN, M., e NORMAN, D. Ex vivo application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp. efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 2, p. 478-490, 2016.
- AMORIO, D. J. H.; CUMAGUN, C. J. R. Pathogenicity and cytological examination of adapted and non-adapted *Bipolaris* species on resistant and susceptible cultivars of rice and corn. **Mycosphere**, v. 8, n. 3, p. 377-391, 2017.
- ARDAKANI, A. S. Toxicity of silver, titanium and silicon nanoparticles on the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, and growth parameters of tomato. **Nematology**, v. 15, n. 6, p. 671-677, 2013.
- AZAMBUJA, I. H. V.; VERNETTI Jr., F. J.; MAGALHÃES Jr., A. M. Aspectos socioeconômicos da produção de arroz. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES Jr., A.M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, p. 23-44, 2004.
- BALARDIN, R. S. Controle de doenças na cultura do arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1999, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 1999. v.1, p. 396-398.
- BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do Arroz. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v.2. 5 ed., p.87-99.
- CACIQUE, I.S., DOMICIANO, G. P., MOREIRA, W. R., RODRIGUES, F. Á., CRUZ, M. F. A., SERRA, N. S., & CATALÃ, A. B. Effect of root and leaf applications of soluble silicon on blast development in rice. **Bragantia**, v. 72, n. 3, p. 304-309, 2013.
- CELMER, A.; MADALOSSO, M. G.; DEBORTOLI, M. P.; NAVARINIE, L.; BALARDIN, R. S. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p. 901-904, 2007.
- CHANG, T. T.; BARDENAS, E. A. **The morphology and varietal characteristics of the rice plant**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1965. 40 p.
- CHEN, H. F., Wu, J. J., Wu, M. Y., & Jia, H. Preparation and antibacterial activities of copper nanoparticles encapsulated by carbon. **New Carbon Materials**, v. 34, n. 4, p. 382-389, 2019.
- CHOUDHURY, S. R.; NAIR, K. K.; KUMAR, R.; GOGOI, R.; SRIVASTAVA, C.; GOPAL, M.; SUBHRAMANYAM, B. S.; DEVAKUMAR, C.; GOSWAMI, A. Nanosulfur: a potent fungicide against food pathogen, *Aspergillus niger*. **AIP Conference Proceedings**, v. 1276, p. 154-157, 2010.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2018/19, n. 5 – Quinto Levantamento. Brasília: Conab, 2020.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. A cultura do arroz. Brasília: Conab, 2017, p. 13-23.
- CORRÊA, C. L. **Sobrevivência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz armazenadas sob duas condições ambientais**. 2006. 36 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHATTERJEE, A. K.; CHAKRABORTY, R.; BASU, T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 25, n. 13, p. 135101, 2014.

CHOWDHURY, S.; BASU, A.; KUNDU, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. **Nanoscale research letters**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.

CHOWDAPPA, P.; GOWDA, S. Nanotechnology in crop protection: status and scope. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, v. 19, n. 2, p. 131-151, 2013.

CROMWELL, W. A., YANG, J., STARR, J. L., e JO, Y. K. Nematicidal effects of silver nanoparticles on root-knot nematode in bermudagrass. **Journal of nematology**, v. 46, n. 3, p. 261, 2014.

DA SILVA FILHO, C. R., SOUZA, A. G. D., CONCEIÇÃO, M. M. D., SILVA, T. G. D., SILVA, T., & RIBEIRO, A. P. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 919-923, 2009.

DASTJERDI, R., MONTAZER, M., e SHAHSAVAN, S. Colloids and Surfaces A: **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 345, p. 202-210, 2009.

DALLAGNOL, L. J., NAVARINI, L., BALARDIN, R. S., GOSENHEIMER, A., e MAFFINI, A. A. Dano das doenças foliares na cultura do arroz irrigado e eficiência de controle dos fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 313-318, 2006.

DATNOFF, L. E.; DEREN, C. W.; SNYDER, G. H. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. **Crop protection**, v. 16, n. 6, p. 525-531, 1997.

DE BARY, A. Vergleichende Morphologie u. **Biologie der Pilz usw**, 1884.

DURÁN, N. C.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (Ed.). **Nanotecnologia: introdução preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações**. São Paulo: Artliber, 2005.

DUHAN, J. S., KUMAR, R., KUMAR, N., KAUR, P., NEHRA, K., & DUHAN, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 11-23, 2017.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do Arroz de Terras Altas no Estado de Mato Grosso**. Embrapa Arroz e Feijão Set, 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao/inovacao-tecnologica/arroz-de-terras-altas>. Acesso em: 08 de fev. 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Nanotecnologia na Agricultura Aumenta seu Papel Social e de Inclusão**. 2010. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/outubro/2a-semana/nanotecnologia-na-agricultura-aumenta-seu-papel-social-e-de-inclusao/>. Acesso em: 08 fev. 2021.

ESPITIA, P. J. P.; OTONI, C. G.; SOARES, N. F. F. Zinc oxide nanoparticles for food packaging applications. In: **Antimicrobial food packaging**. Academic Press, 2016. p. 425-431.

EUROPEIA, Comissão. Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité Económico e Social Europeu e ao Comité das Regiões: (736 final). 2012.

ELBESHEHY, Essam KF; ELAZZAZY, Ahmed M.; AGGELIS, George. Síntese de nanopartículas de prata mediada por novos isolados de *Bacillus* spp., Caracterização de nanopartículas e sua atividade contra o vírus do mosaico amarelo do feijão e patógenos humanos. **Fronteiras em microbiologia**, v. 6, p. 453, 2015.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. World production of grains and rice, 2019. Disponível em < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> > Acesso em: 02 jan 2021.

FARIAS, C. R. J.; AFONSO, A. P. S.; BRANCÃO, M. F.; PIEROBOM, C. R. Ocorrência de *Alternaria padwickii*

(Ganguly) em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) (Poaceae) produzidas em quatro regiões orizícolas do Rio Grande de Sul e seu efeito sobre plântulas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 245-249, 2007.

FRATTINI, A.; PELLEGRINI, N.; NICASTRO, D.; SANCTIS, O. D. Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. **Materials Chemistry and Physics**. 94, p. 148-152, 2005.

FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Revista Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, 2011.

GAWANDE, M.B., GOSWAMI, A. F, F. X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R., ... & Varma, R. S. Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. **Chemical reviews**, v. 116, n. 6, p. 3722-3811, 2016.

GIANNOUSI, K.; AVRAMIDIS, I.; DENDRINO-SAMARA, C. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. **Royal Society of Chemistry**, v. 3, n. 1. P. 21743–21752, 2013.

HAYASAKA, T.; FUJII, H.; ISHIGURO, K. The role silicon in preventing appressorial penetration by the rice blast fungus. **Phytopathology**; v.98, n.9, p.1038-1044, 2008.

KASPROWICZ, M. J.; KOZIOL, M.; GORCZYCA, A. O efeito das nanopartículas de prata sobre os esporos fitopatogênicos de *Fusarium culmorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247-253, 2010.

KIM, F.; SONG, J. H.; YANG, P. Photochemical synthesis of gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 48, p. 14316-14317, 2002.

KHIYAMI, M. A., Almoammar, H., Awad, Y. M., Alghuthaymi, M. A., e Abd-Elsalam. Plant pathogen nanodiagnostic techniques: forthcoming changes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 775-785, 2014.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Bethesda, v. 35, n. 2, p. 25-34, 1997.

KORNDORFER, G. H.; DATNOFF, L. E. Adubação com silício: uma alternativa no controle de doenças da cana-de - açúcar e do arroz. Piracicaba: **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v.70, p. 1-5, 1995.

KRISHNARAJ, C., Jagan, E. G., Ramachandran, R., Abirami, S. M., Mohan, N., e Kalaichelvan, P. T. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. **Process biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 651-658, 2012.

KUMARI, S.; KUMAR, A.; RANI, S. Morphological characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown spot of paddy in Bihar. **International Education & Research Journal**, v. 1, n. 5, p. 84-87, 2015.

LAMSA, K., Kim, S. W., Jung, J. H., Kim, Y. S., Kim, K. S., & Lee, Y. S. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. **Mycobiology**, v. 39, n. 1, p. 26-32, 2011.

LISIECKI, I.; PILENI, M. P. Synthesis of copper metallic clusters using reverse micelles as microreactors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 10, p. 3887-3896, 1993.

LORENÇONI, R. **Caracterização fisiológica de diferentes genótipos de arroz de terras altas**. 2013. 131 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S. DOS; RIBEIRO, A. S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in plant science**, v. 11, n. 8, p.

392-397, 2006.

MALAVOLTA, E., FAVARIN, J. L., MALAVOLTA, M., CABRAL, C. P., HEINRICHS, R., & SILVEIRA, J. S. M. Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, n. 7, p. 1017-1022, 2002.

MARANHÃO. Secretaria da Agricultura. Departamento de Pesquisas e Experimentação. A cultura do arroz no Estado do Maranhão. São Luiz, 1972.

MATTOSO, L. H. C. **Rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2005.

MAHMOODI, S.; ELMI, A.; HALLAJ-NEZHADI, S. Copper nanoparticles as antibacterial agents. **Journal of Molecular Pharmaceutics Organic Process Research**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2018.

NASSAR, N. N. The application of nanoparticles for wastewater remediation. **Applications of Nanomaterials for Water Quality**, London, p. 52-65, 2013.

ISMAAIL OCSOY, M.L, PARENT, M.A, S.K, TAO CHEN, M.Y, WEIHONG TAN. Nanotecnologia no manejo de doenças em plantas: nanopartículas de prata dirigidas por DNA em óxido de grafeno como um antibacteriano contra *Xanthomonas perforans*. **Acs Nano**, v. 7, n. 10, pág. 8972-8980, 2013.

OTTONI, G.; OLIVEIR, W. F. DE; SILVA, A. L.; ALBERNAZ, K. C.; SILVA, E. G.; CARDOSO, E.; GUICHERIT, E. Eficiência de fungicidas no controle de mancha parda (*Bipolaris oryzae*) em arroz (*Oryza sativa*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 59-62, 2000.

PARIONA, N., MTZ-ENRIQUEZ, A. I., SÁNCHEZ-RANGEL, D., CARRIÓN, G., PARAGUAY-DELGADO, F., E ROSAS-SAITO, G. Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens. **RSC advances**, v. 9, n. 33, p. 18835-18843, 2019.

PINTO, M. A. B. **Irrigação por aspersão em arroz em função da tensão de água no solo**. 2015. 68p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração: Solos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

PRABHU, A. S.; VIEIRA, N. R. A. Sementes de arroz infectadas por *Drechslera oryzae*: germinação, transmissão e controle. **Embrapa Arroz e Feijão-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 1989.

PRASAD, R.; KUMAR, V.; PRASAD, K. S. Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 705-713, 2014.

PRATHNA, T. C., CHANDRASEKARAN, N., RAICHUR, A. M., e MUKHERJEE, A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 152-159, 2011.

QUINTANA, L.; GUTIÉRREZ, S.; ARRIOLA, M.; MORINIGO, K.; ORTIZ, A. Rice brown spot *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker in Paraguay. **Tropical Plant Research**, v.4, n.3, p.419-420, 2017.

JOSHI, S. S., PATIL, S. F., IYER, V., e MAHUMUNI, S. Radiation induced synthesis and characterization of copper nanoparticles. **Nanostructured materials**, v. 10, n. 7, p. 1135-1144, 1998.

RAI, M., INGLE, A. P., PANDIT, R., PARALIKAR, P., SHENDE, S., GUPTA, I., e DA SILVA, S. S. Copper and copper nanoparticles: role in management of insect-pests and pathogenic microbes. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 303-315, 2018.

RAI, M.; DURAN, Nelson (Ed.). **Metal nanoparticles in microbiology**. Springer Science & Business Media, 2011.

RIBEIRO, W. R. **Doenças da cultura do arroz (*Oryza sativa*)**. Estudo de doenças de plantas. IF Goiano câmpus Urutaí – GO, 2010.

RODRIGUES, F. A., BENHAMOU, N., DATNOFF, L. E., JONES, J. B., e BÉLANGER, R. R. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, v. 93, n. 5, p. 535-546, 2003.

RODRIGUES, F. A., MCNALLY, D. J., DATNOFF, L. E., JONES, J. B., LABBÉ, C., BENHAMOU, N., e BÉLANGER, R. R. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 177-183, 2004.

RODRIGUES, F. A., JURICK II, W. M., DATNOFF, L. E., JONES, J. B., e ROLLINS, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 144-159, 2005.

ROSSMAN, A. Y.; MANAMGODA, D. S.; HYDE, K. D. Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae). **Taxon**, v.62, n.6, p. 1331–1332, 2013.

SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. A cultura do arroz no Brasil. **Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás**, 2006.

SAHOO SK, PARVEEN S, PANDA J.J. O presente e o futuro da nanotecnologia: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1): 20-31, 2007.

SCHURT, D. A., RODRIGUES, F. A., CARRÉ-MISSIO, V., e SOARES, N. F. F. Silício alterando compostos derivados da pirólise de bainhas foliares de plantas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 52-60, 2013.

SCHWANCK, A. A. **Mancha parda em arroz: importância epidemiológica da incidência de *Bipolaris oryzae* na semente, padrão espacial de lesões nas folhas e escala diagramática de severidade**. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia com Ênfase em Fitopatologia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SERVIN, A., ELMER, W., MUKHERJEE, A., DE LA TORRE-ROCHE, R., HAMDI, H., WHITE, J. C., e DIMKPA, C. A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 1-21, 2015.

SOLOS, Embrapa. Relatório de Gestão 2009. **Embrapa Solos. Documentos**, 2009.

SINGH, D. P.; OJHA, A. K.; SRIVASTAVA, O. N. Synthesis of different Cu (OH) 2 and CuO (nanowires, rectangles, seed-, belt-, and sheetlike) nanostructures by simple wet chemical route. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 9, p. 3409-3418, 2009.

SOSBAI, SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas de pesquisa para o Sul do Brasil**. Sosbai, 2007.

TATAGIBA, S. D., MORAES, G. A. B. K., NASCIMENTO, K. J. T., & PELOSO, A. F. Limitações fotossintéticas em folhas de plantas de tomateiro submetidas a crescentes concentrações salinas. 2014.

VAN NGHIEP, H.; GAUR, A. Efficacy of seed treatment in improving seed quality in rice (*Oryza sativa* L.). **Omonrice**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2005.

YADAV, L., TRIPATHI, R. M., PRASAD, R., PUDAKE, R. N., e MITTAL, J. Antibacterial activity of Cu nanoparticles against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Nano Biomed Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2017.

YOON, K.; BYEON, J. H.; PARK, J.; HWANG, J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 373, p. 572–575, 2007.

CAPÍTULO II

NANOPARTÍCULAS DE COBRE E PRATA REDUZEM A MANCHA PARDA EM FOLHAS DE ARROZ

**Nanopartículas de Cobre e Prata reduzem a Mancha Parda em Folhas de
Arroz**

Felipe Sousa¹, Keyla Silva¹, Larissa Almeida¹, Jonas Rios^{1*}

ORCID:

F. A. Sousa: 0000-0001-5867-7397

J.A. Rios: 0000-0003-1132-2892

L. C. Almeida: 0000-0002-1091-8443

K. W. Silva: 0000-0003-2798-0347

¹ Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife/PE

* Jonas Rios – jonasufrpe@gmail.com

RESUMO

A mancha parda (MP), causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito e Kuribayashi)], causa grandes perdas em todas as regiões produtoras de arroz no mundo. Este trabalho objetivou avaliar o efeito de Nanopartículas (NPs) de Prata e NPs de Cobre sobre esta doença. Primeiramente, testes *in vitro* foram realizados para verificar o crescimento de *B. oryzae* em placas de petri com doses crescentes de ambas NPs. Posteriormente um experimento *in vivo* foi instalado em condições de casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado em 10 repetições, sendo utilizadas as cultivares de arroz Pampeira, A702Cl e Tropical. Os tratamentos utilizados foram: água destilada (tratamento controle), fungicida Azoxystrobina, NPs de prata ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) e NPs de cobre ($5 \mu\text{L L}^{-1}$). A inoculação com *B.oryzae* foi realizada 24 horas após a aplicação dos tratamentos utilizando a concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} . Para todos os testes *in vitro*, os ajustes de regressão linear para o índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro micelial e número de conídios de *B. oryzae* demonstraram uma redução destes parâmetros a medida que as doses de NPs de prata e NPs de Cobre aumentaram. A área abaixo da curva de progresso da doença foi significativamente reduzida em 92, 31 e 33 % para Pampeira, 92, 25 e 57 % para A702Cl e 92, 33 e 58 % para Tropical, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata em comparação com o tratamento controle. Esta mesma tendência de redução foram observadas para os demais componentes de resistência como a severidade final, tamanho de lesão e número de lesões por cm^2 . Contudo, os resultados do presente estudo demonstraram a eficiência das NPs de cobre e, principalmente, NPs de prata no controle de MP do arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, *Bipolaris oryzae*, nanotecnologia, atividade antifúngica

1. INTRODUÇÃO

A mancha parda é causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoemaker (sin. *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subramanian & Jain), (Teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus*) pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (ROSSMAN et al., 2013). É a segunda doença mais importante na cultura do arroz, sendo superada apenas pela brusone (*Pyricularia oryzae*) (Ou, 1985). A mancha parda pode afetar negativamente a qualidade e a produtividade de grãos, podendo ser reduzida em até 74% no rendimento da cultura (Kohls et al., 1987). Após deposição sobre a superfície da folha de arroz, os conídios germinam e secretam toxinas não seletivas, como as ofiobolinas A e B, que contribuem para o desenvolvimento de sintomas (Xiao et al., 1991) e suprimem as respostas de defesa do hospedeiro (Tullis, 1935; Vidhyasekaran et al., 1992). O fungo pode penetrar nos estômatos ou penetrar diretamente através da cutícula, sendo o período de incubação inferior a 18 horas (Tullis, 1935; Dallagnol et al., 2009). Os sintomas característicos da MP são lesões castanho-avermelhado circundado por um halo amarelo e com um centro cinza (Ou, 1985; Dallagnol et al., 2011a).

As estratégias de controle desta doença são limitadas devido à ausência de cultivares com altos níveis de resistência (Ou, 1985; Dallagnol et al., 2011b). Consequentemente, a pulverização de fungicidas tem sido a principal estratégia empregada pelos produtores para reduzir os danos causados por *B. oryzae* (Ou, 1985). Dentre estes fungicidas, as estrobilurinas constituem uma das principais classes utilizadas para o controle de doenças em plantas devido a seu caráter sistêmico (Bartlett et al., 2002). As estrobilurinas inibem a produção de energia no fungo, por reduzir a capacidade de transporte de elétrons na mitocôndria (Ypema e Gold, 1999; Bartlett et al., 2002; Köehle et al., 2003; Venancio et al., 2003). Estrategicamente, as

estrobilurinas são altamente eficazes quando pulverizadas preventivamente e sua eficiência diminui drasticamente após a penetração do fungo (Ypema e Gold, 1999; Bartlett et al., 2002). Contudo, é notório que nos últimos anos tem surgido a necessidade de procurar novos agentes de controle efetivos contra patógenos, preferencialmente naturais e que não sejam tóxicos ao meio ambiente. Assim, o uso da nanotecnologia surge como uma nova estratégia de prevenção e tratamento de doenças de plantas causadas por vírus, bactérias, fungos, oomicetos e nematoides; melhorando a produtividade das culturas e maximizando a eficiência do uso de recursos naturais para a segurança alimentar e ambiental (Santiago et al., 2017).

Atualmente, o termo nanotecnologia refere-se ao estudo dos fenômenos e manipulação de estruturas escala nanométricas (10^{-9} m = 1 nm) com dimensões que normalmente que não exceda 100 nm, (Sahoo et al., 2007). Várias são as pesquisas que têm confirmado que uso de nanopartículas (NPs) de metais são eficiente contra patógenos de plantas, insetos e pragas (Choudhury et al., 2010; Rai; Ingle, 2012). Atualmente, os nanomateriais mais comuns usados para controlar fungos são aqueles que contêm prata, zinco, carbono, cobre, manganês, sílica, alumínio ou quitosana (Álvarez-López et al., 2016). A prata é o metal de transição mais estudados na literatura, especialmente com relação ao desenvolvimento de novas metodologias de preparação de nanopartículas e por ser um material tecnologicamente importante (Fratini et al., 2005).

Em prévios estudos tem se verificado que as NPs de prata exibem forte atividade inibitória para fungos fitopatogênicos como *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker (1959) e *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr (1977) (Jo et al., 2009); *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (1892) (Kasprowicz et al., 2013); *Colletotrichum* spp. (Lamsal et al., 2011); *Rhizoctonia solani* Kühn (1858), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (1884); *Botrytis cinerea* Pers. (1794) (Krishnaraj et al., 2012); *Phytophthora* spp. (Ali et al., 2015); e outros fungos e

oomicetos.

Embora os mecanismos definitivos de ação de NPs de prata contra fungos não estejam totalmente elucidados, existem muitas hipóteses incluindo a inibição da respiração celular, inativação de enzimas, distúrbios da função de proteínas e a interação com o fósforo em moléculas de DNA levando ao comprometimento da replicação celular (Prathna et al., 2011; Servin et al., 2015). NPs de cobre são sintetizadas desde o início de 1990 (Lisiecki et al., 1993; Qi et al., 1997) Estas surgiram como uma nova classe de compostos antimicrobianos com potencial contra uma variedade de patógenos (Gawande et al., 2016; Rai et al., 2018), incluindo aqueles que desenvolveram resistência aos produtos químicos (Singh et al., 2009; Chowdhury et al., 2014). Uma das teorias mais predominantes é que NPs à base de cobre danificam a membrana celular, alterando sua permeabilidade, causando assim morte celular (Chatterjee et al., 2014; Yadav et al., 2017; Rai et al., 2018). Outro mecanismo hipotético refere-se ao dano celular oxidativo devido à peroxidação lipídica e degradação do DNA pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (Chatterjee et al., 2014; Mahmoodi et al., 2018). Também é possível que os NPs interfiram em processos bioquímicos essenciais, como o DNA replicação pela absorção de seus íons metálicos (Chatterjee et al., 2014; Yadav et al., 2017; Mahmoodi et al., 2018). Assim, recentes estudos indicam que as NPs de cobre atua pela combinação de diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais do patógeno, associado a inibição da expressão gênica de fatores de virulência no patógeno (Yadav et al., 2017; Chen et al., 2019). Na proteção de plantas, NPs de cobre têm demonstrado eficácia contra *Fusarium* sp., *Phoma destructiva*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* e *Rhizoctonia solani* (Pariona et al., 2019).

Considerando a necessidade de se utilizar produtos alternativos efetivos e menos tóxicos durante o controle de doenças, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação

preventiva de NPs de prata e cobre sobre o desenvolvimento da mancha parda do arroz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Testes *in vitro*

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dois testes *in vitro* foram realizados para verificar a sensibilidade de *B. oryzae* às NPs de prata e cobre, sendo o primeiro teste utilizando as concentrações 0; 1; 5; 10; 25; 50 e 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ em meio batata-dextrose-água (BDA) para ambas nanopartículas. Similarmente, no segundo teste *in vitro* foram utilizadas as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ para NPs de prata e 0, 1; 2; 3; 4 e 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ para NPs de cobre. Para ambos testes foi utilizado um controle positivo com placas contendo o fungicida Azoxystrobina (Priori®, Syngenta, Basel, witzerland, 2 mL L^{-1}). O meio de cultura BDA foi preparado na concentração de 39 g L^{-1} , autoclavado (121°C por 15 minutos). Posteriormente, a concentração de cada tratamento foi ajustada e o meio vertido com um volume de 10 mL por placa de Petri. Em seguida, um plugue de BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio fúngico obtido da borda de uma colônia de *B. oryzae* com 10 dias de idade, foi colocado no centro das placas de Petri, que foram mantidas em uma câmara de crescimento (25 °C e fotoperíodo de 12 h). A colônia do fungo em cada placa de Petri foi medida para obter seu diâmetro em duas direções ortogonais em 48, 96, 144 e 192 e 240 h usando um paquímetro digital. Para cada combinação de dose das nanopartículas e do fungicida foram utilizadas 12 placas de Petri, sendo que cada uma correspondeu a uma repetição. O índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo adaptação da fórmula proposta por Maguire (1962):

$$\text{IVCM} = (C_1 / N_1) + (C_2 / N_2) + \dots + (C_n / N_n)$$

Em que: C_1 , C_2 e C_n = diâmetro da colônia na primeira, segunda e n-ésima avaliação; N_1 , N_2 ,

N_n = número de dias após a instalação do ensaio.

2.2 Cotagem de número de esporos

Adicionou-se 10 mL de água destilada em cada placa e a colônia fúngica foi levemente raspada, 10 μ L da suspensão foram retiradas e a contagem de esporos determinado com auxílio da câmara de Neubauer, a contagem foi realizada em duplicata.

2.3. Experimentos *in vivo*

2.3.1 Crescimento de plantas e preparo da solução nutritiva

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em condições de casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Três genótipos de arroz foram utilizados sendo o A70CL (suscetível), e os genótipos Tropical e Pampeira (moderadamente resistente a mancha parda) (Embrapa, 2018). As sementes foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio durante 1 min e, posteriormente, em água destilada por 3 min. Em seguida, cinco sementes foram germinadas em vasos contendo 1 dm³ de substrato composto de uma mistura de 1: 1: 1 de casca de pinheiro, turfa e vermiculita expandida ((Basaplant ®, Artur Nogueira, São Paulo, Brazil). O substrato em cada vaso foi fertilizado com uma solução nutritiva contendo o seguinte em g L⁻¹: 6,4 KCl; 3,48 K₂SO₄; 5,01 MgSO₄.7H₂O; 2,03 (NH₂)₂CO; 0,009 NH₄MO₇O₂₄.4H₂O; 0,054 H₃BO₃; 0,222 ZnSO₄.7H₂O; 0,058 CuSO₄.5H₂O; 0,137 MnCl₂.4H₂O; 0,27 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 0,37 g L⁻¹ de EDTA bisódico (Xavier filha et al., 2011). Um volume de 50 mL de solução nutritiva foi aplicado semanalmente após a emergência das mudas.

2.3.2 Pulverização dos tratamentos

Os tratamentos utilizados nos experimentos foram: água destilada (tratamento controle), Azoxystrobina (Priori®, Syngenta, Basel, witzerland, 2 ml c.p.L⁻¹), nanopartículas de Ag⁺ (5 μ L L⁻¹, pH ajustado de 6,2) e nanopartículas de Cu (5 μ L L⁻¹, pH ajustado de 6,2). Estes

produtos foram aplicados 24 horas antes da inoculação das plantas usando um atomizador VL Airbrush (Paasche Airbrush Co, Chicago, IL).

2.3.3 Procedimento de Inoculação

As plantas de arroz foram inoculadas com *B. oryzae* no estágio de crescimento V8 (Counce et al., 2000). A preservação do patógeno e o preparo do inóculo foram realizados de acordo com Dallagnol et al. (2011a). Uma suspensão de conídios de *B. oryzae* (1×10^5 conídios mL^{-1}) foi aplicada como uma névoa fina nas folhas de cada planta até o escoamento, usando um atomizador VL Airbrush (Paasche Airbrush Co., Chicago, IL, EUA). Gelatina (1%, p. v⁻¹) e adicionada à água estéril para auxiliar a adesão dos conídios às folhas. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 ° C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$ e foram submetidas a um período inicial de 24 horas sem a presença de luz. Após este período, as plantas foram transferidas para uma câmara clara coberta com plástico transparente com temperatura de 25 ± 30 ° C onde permaneceram até o final do experimento.

2.3.4 Avaliação dos componentes de resistência a mancha parda

Foram avaliadas as seguintes variáveis epidemiológicas: severidade na folha (SevMM), tamanho final da lesão (TL) e número de lesões por centímetro quadrado (NL). A quinta folha da base ao ápice de cada planta foi marcada e utilizada para avaliar as variáveis epidemiológicas acima mencionadas. O SevMM na folha marcada de cada planta foi pontuado 48 e 72 após a inoculação (hai), usando uma escala baseada na porcentagem de área foliar doente (Lenz et al., 2010). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada folha em cada planta foi calculada usando a integração trapezoidal da curva de progresso da MP ao longo do tempo usando a fórmula proposta por Shaner e Finney (1979). O TL (mm) de vinte lesões aleatórias na folha marcada de cada planta, foram medidas usando um paquímetro digital eletrônico. O

NL de dez áreas aleatórias na folha marcada de cada planta foi determinado.

2.3.5 Análise Estatística

Os experimentos *in vitro* foram realizados em condições de laboratório em um delineamento inteiramente casualizado. Dentro de cada período avaliado, as médias das doses de cada tratamento foram comparadas usando análise de regressão. Os experimentos *in vivo* foram realizados em condições de casa de vegetação em um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial (3 x 4) sendo o primeiro fator a resistência de cultivar (dois genótipos moderadamente resistente e um genótipo suscetível a *B. oryzae*) e o segundo aplicação dos tratamentos (aplicação de nanopartículas (Cu e Ag⁺), Azoxystrobina e água (controle). Cada unidade experimental consistirá em um vaso de plástico contendo cinco plantas. Os dados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Dentro de cada tempo de amostragem, as médias dos tratamentos foram comparadas usando um *t* ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS (v. 6.12; SAS Institute, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1. Testes *in vitro*

Para todos os testes *in vitro*, os ajustes de regressão linear para o IVCm, diâmetro micelial e número de conídios de *B. oryzae* demonstraram uma redução destes parâmetros a medida em que as doses de NPs Cobre e NPs Prata aumentaram (Fig. 1 e 2). Para o teste *in vitro* 1, houve uma redução do IVCm de 90 e 95% para as doses 5 e 10 µL de NPs Cobre, respectivamente, comparado ao controle. Similarmente para o diâmetro micelial, esta redução foi de 93 e 97% (Fig. 1A). Comparado ao controle, o IVCm foi reduzida em 70, 77 e 73% nas doses de 1, 5 e 10 µL de NPs Prata, respectivamente. Similarmente para o diâmetro micelial, esta redução foi de 76, 83 e 82% (Fig.1B). Um novo ajuste de doses foi verificado no teste *in*

vitro 2, sendo observado uma redução de 31, 23, 72, 83 e 89 % para as NPs Cobre nas doses 1, 2, 3, 4 e 5 µL e de 65, 74, 69, 73, 82 e 88% para as NPs Cobre nas doses 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2.5 e 5 µL (Fig. 2). Para as análises estatísticas qualitativas dos parâmetros do teste *in vitro* 2, foram selecionadas somente as doses de 5 µL de ambas NPs. Assim, houve uma redução significativa do IVCm de 81, 83 e 87% para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata, respectivamente, em comparação com o tratamento controle. Similarmente para o diâmetro micelial, esta redução significativa foi de 65, 86 e 89% (Fig. 2). O número de esporos foi significativamente reduzida em 63, 96 e 89%, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata em comparação com o tratamento controle (Fig. 3).

3.2. Experimentos *in vivo*

Componentes de Resistência (Severidade, NL, TL e AACPD)

Os efeitos isolados dos fatores cultivares e tratamentos, bem como as interações destes sobre os componentes de resistência estão representados na Tabela 1. A intensidade da mancha parda progrediu muito mais rápido nas folhas do tratamento controle das plantas das cultivares Pampeira, Tropical e A702Cl em comparação aos demais tratamentos (Fig. 4 e 5). A severidade final foi significativamente reduzida em 94, 36 e 84% para Pampeira, 93,15 e 43 % para A702Cl e 92, 27 e 68 % para Tropical, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata em comparação com o tratamento controle (Fig. 4). Similarmente para o NL, houveram reduções significativas 88, 26 e 53% para Pampeira, e 87, 31 e 47 % para Tropical, respectivamente, às 96 hai. (Fig. 5A). Para este período na cultivar A702Cl, o NL foi estatisticamente reduzido em 91 e 64 % para os tratamentos com azoxitrobina e NPs Prata, respectivamente. Comparado ao tratamento controle, o TL foi significativamente reduzida em 76 e 60% para Pampeira, 72 e 64 % para A702Cl e 69 e 49 % para Tropical, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina e NPs Prata às 96 hai (Fig. 5B). A AACPD foi

significativamente reduzida em 92, 31 e 33 % para Pampeira, 92, 25 e 57 % para A702Cl e 92, 33 e 58 % para Tropical, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata em comparação com o tratamento controle (Fig. 5C).

4. DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em informações envolvendo o uso de NPs de cobre e prata no controle da MP do arroz. Atualmente, a aplicação de fungicidas é o método de controle mais recomendado para o controle de *B. oryzae*. Contudo, este trabalho demonstrou que o uso de NPs de cobre e, principalmente, NPs de prata são alternativas efetivas contra os sintomas desta doença. Prévios estudos também demonstraram a eficiência de NPs para diferentes patógenos como *B. sorokiniana* e *Magnaporthe grisea* (Jo et al., 2009); *Fusarium culmorum* (Kasprowicz et al. 2010); *Colletotrichum* spp. (Lamsal et al., 2011), *Botrytis cinerea* (Krishnaraj et al. 2012) e *Phytophthora* spp. (Ali et al., 2015). De acordo com KHAN e RIZVI (2014), o uso de nanopartículas no manejo de doenças de plantas é uma abordagem muito eficaz sendo otimizada com o progresso da nanotecnologia.

Para determinar o efeito antifúngico das NPs de cobre e prata sobre *B. oryzae*, foram realizados experimentos *in vitro* onde o crescimento micelial do fungo foi avaliado através de diferentes variáveis. O fungicida apresentou um efeito intermediário de controle de *B. oryzae* *in vitro*. Esta menor inibição micelial da azoxitrobina, uma *quinona* oxidase (*QoI*), é justificada pelo fato desta estrobirulina afetar a germinação dos esporos e sua penetração nos tecidos do hospedeiro (Bartlett et al., 2002), sendo estes efeitos melhores analisados nos experimentos *in vivo*. Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que ambas NPs apresentam efeitos inibitórios significativos ou atividade antifúngica durante a formação de colônias de *B. oryzae*. De fato, foi verificado uma inibição significativa do crescimento e do diâmetro fúngico a partir

da concentração de $5 \mu\text{L}^{-1}$ para NPs de cobre e de $1 \mu\text{mL}^{-1}$ para NPs prata. Este efeito antifúngico das NPs de cobre *in vitro* também foi verificado para os fungos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Monilia fructicola* (Ouda et al 2014; Malandrakis et al 2019). Similarmente, as NPs prata também inibiram o crescimento *in vitro* de *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Curvularia lunata* (Krishnaraj et al., 2012; Villamizar-Gallardo, Cruz e Ortiz-Rodrigues, 2016). O efeito direto das NPs de prata sobre fungos tem sido elucidado e associado a inibição da respiração celular, inativação de enzimas, distúrbios da função de proteínas e a interação com o fósforo em moléculas de DNA levando ao comprometimento da replicação celular (Prathna et al., 2011; Servin et al., 2015). Em fungos, as NPs de prata podem causar mudanças estruturais em hifas, deformações da parede celular, danos à membrana e alterações morfológicas dos esporos durante a germinação (Villamizar-Gallardo, Cruz e Ortiz-Rodrigues, 2016). Prévios estudos propuseram que NPs à base de cobre danificam a membrana celular, alterando sua permeabilidade, causando assim lise e morte celular (Chatterjee et al., 2014; Yadav et al., 2017; Rai et al., 2018). Outro mecanismo hipotético refere-se ao dano celular oxidativo devido à peroxidação lipídica e degradação do DNA pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (Chatterjee et al., 2014; Mahmoodi et al., 2018). Assim, as NPs de cobre podem afetar os mecanismos bioquímicos e estruturais do fungo, associado a inibição da expressão gênica de fatores de virulência no patógeno (Yadav et al., 2017; Chen et al., 2019).

No presente estudo, os experimentos *in vivo* determinaram que a aplicação preventiva de NPs de cobre e, principalmente, NPs de prata reduzem os sintomas de MP em três genótipos de arroz (Pampeira, Tropical e A702Cl). As NPs de prata e cobre tem apresentado atividade antifúngica em trabalhos utilizando pulverização prévia (Lamsal et al. 2011; Carvalho et al,

2019) ou após a inoculação do patógeno (Mishra et al., 2014), sendo eficácia de controle variável de acordo com os patossistemas. Plantas de trigo inoculadas com *B. sorokiniana* e pulverizadas com NPs de prata apresentaram menor nível de sintomas de mancha marrom, sendo este efeito associado a maior lignificação de parede celular das folhas (Mishra et al., 2014). A aplicação de NPs de prata realizadas 24 horas após a inoculação apresentou maior controle comparado a aplicação preventiva em feijoeiro infectado com o *Bean Yellow Mosaic Virus* (Elbeshehy et al. 2015). Por outro lado, Lamsal et al. (2011) observaram maior incidência do oídio em plantas de pepino pulverizadas com Nps de prata após o início da doença. Aqui, a prévia aplicação de NPs proporcionou alto nível de controle à MP, sendo este efeito possivelmente associado à presença residual das NPs nas folhas que afetaram direta e negativamente o processo infeccioso de *B. oryzae*. Adicionalmente, espera-se um efeito indireto onde a prévia aplicação de NPs de prata e cobre aumentariam as respostas de defesa das plantas de arroz contra o patógeno. De acordo com Elmer et al., (2016), as NPs de prata e cobre podem estar relacionadas com ativação de respostas de defesa em plantas. Plantas de café tratado previamente com NPs de prata e cobre apresentaram maior teor de lignina e compostos fenólicos, reduzindo a infecção de *Cercospora coffeicola* (Carvalho et al., 2019). Plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com NPs Prata apresentaram maior acúmulo de compostos fenólicos e fitoalexinas, sendo estes metabólitos importantes no processo de defesa de plantas contra patógenos (Kruszka et al., 2020).

Portanto, a aplicação preventiva de NPs de cobre e, principalmente, NPs de prata são uma alternativa no controle da MP em arroz. Contudo, estudos devem ser realizados objetivando elucidar os mecanismos de resistência em folhas que são induzidos por estas NPs durante a defesa contra *B. oryzae*.

5. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado. A Prof^a Thaís Ribeiro Santiago, Universidade de Brasília, pelo preparo e envio das Nanopartículas de cobre e prata. A pesquisadora Marta Cristina Corsi De Filippi, Embrapa arroz e feijão, pelo fornecimento das sementes dos genótipos de arroz.

6. REFERÊNCIAS

- Ali GS, El Sayed AS, Patel JS, Green KB, Ali M, Brennan M, Norman D (2015) Ex vivo application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp: efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 82(2): 478-490.
- Álvarez-López V, Prieto-Fernández Á, Cabello-Conejo MI, Kidd PS (2016) Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. *Science of the total environment*, 548: 370-379.
- Barr, ME (1979) A classification of *Loculoascomycetes*. *Mycologia*, 71(5): 935-957.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR (2002) The strobilurin fungicides. *Pest management science*, West Sussex 58(7): 649-662.
- Carvalho BL, Souza EP, Anjos LVS, Nakada-Freitas PG, Cardoso AII, Amador TS, Magalhães TH (2019) Tratamento de sementes de cebola com extrato de própolis e *Plectranthus amboinicus* no controle de *Aspergillus* sp. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, 13(1): 12-18.
- Chatterjee AK, Chakraborty R, Basu T (2014) Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* 25(13): 135101.
- Chen H, Wu J, Wu M, Jia H (2019) Preparation and antibacterial activities of copper nanoparticles encapsulated by carbon. *New Carbon Mater* 34(4): 382–389.
- Chowdhury S, Basu A, Kundu S (2014) Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria 9(1): 1–11.
- Choudhury SR, Nair KK, Kumar R, Gogoi R, Srivastava C, Gopal M, Subhramanyam BS, Devakumar C, Goswami A (2010) Nanosulfur: a potent fungicide against food pathogen,

Aspergillus niger. AIP Conference Proceedings 1276 (1): 154-157.

Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Mielli MVB, Ma JF, Datnoff LE (2009) Defective Active Silicon Uptake Affects Some Components of Rice Resistance to Brown Sport. *Phytopathology* 99: 116-121.

Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Martins SCV, Cavatte PC, DaMatta FM (2011a) Alteration on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathology society* 40(4): 360–365.

Dallagnol LJ, Rodrigues FA, DaMatta FM, Mielli MVB, Pereira SC (2011b) Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice-*Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology* 101(1): 92–104.

Elbeshehy EK, Elazzazy AM, Aggelis G (2015) Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against *Bean Yellow Mosaic Virus* and human pathogens. *Frontiers in microbiology* 6: 453.

Elmer WH, White JC (2016) The use of metallic oxide nanoparticles to enhance growth of tomatoes and eggplants in disease infested soil or soilless medium. *Environmental Science: Nano*, 3(5): 1072-1079.

Fratini A, Pellegrini N, Nicastro D, Sanctis OD (2005) Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. *Materials Chemistry and Physics* 94(1):148-152

Gawande MB, Goswami A, Felpin FX, Asefa T, Huang X, Silva R, Zou X, Zboril R, Varma RS (2016) Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis. *Chemical Reviews* 116(6): 3722–3811.

Jo YK, Kim BH, Jung G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 93(10): 1037-1043.

Khan MR, Rizvi TF (2014) Nanotechnology: Scope and application in plant disease

management. *Plant Pathology Journal*, 13(3): 214-231.

Kasprowicz MJ, Gorczyca A, Frandsen RJ (2013) The effect of nanosilver on pigments production by *Fusarium culmorum* (W.G.Sm) Sacc. *Polish Journal of Microbiology* 62(4): 365–372.

Kohls CL, Percich JA, Huot CM (1987) Perdas na produtividade do arroz selvagem associadas a epidemias de mancha marrom fúngica em estágios de crescimento específicos. *Plant Disease*, 71 (5): 419-422.

Köehle H, Grossmann K, Jabs T, Gerhard M, Kaiser W, Glaab J, Conrath U, Seehaus K, Herms S (2003) Physiological effects of the strobilurin F 500 on plants. In: Lyr H.; Russel PE, Dehne HW, Sisler HD (Eds.). *Modern fungicides and antifungal compounds III* Intercept, Andover. pp. 41-54.

Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry* 47(4): 651-658.

Kruszka D, Sawikowska A, Selvakesavan RK, Krajewski P, Kachlicki P, Franklin G (2020) Nanopartículas de prata afetam a composição fenólica e de fitoalexinas de *Arabidopsis thaliana*. *Ciência do Ambiente Total*, 716: 135361.

Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim YS, Lee YS (2011) Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. *Mycobiology* 39(3): 194-199.

Lisiecki I, Pileni MP (1993) Synthesis of copper metallic clusters using reverse micelles as microreactors. *Journal of the American Chemical society* 115(10): 3887–3896.

Mahmoodi S, Elmi A, Hallaj-Nezhadi S (2018) Copper nanoparticles as antibacterial agents. *Journal of Molecular Pharmaceutics Organic Process Research*, 6(1): 1-7.

Malandrakis AA, Kavroulakis N, Chrysikopoulos CV (2019) Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. *Science of the total environment*, 670: 292-299.

Mishra A, Kumari SM, Pandey V, Chaudhry KC, Guptay CS, Nautiyal (2014) Biocatalytic and an-timicrobial activities of gold nanoparticles synthe-sized by *Trichoderma* sp. *Bioresource Technol.* 166: 235-242.

Ou SH (1985) Rice diseases. 2th Ed. Slough: CAB, Grã Bretanha. Commonwealth Mycological Institute.

Pariona N, Mtz-Enriquez AI, Sánchez-Rangel D, Carrión G, Paraguay-Delgado F, Rosas-Saito G (2019) Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens. *RSC advances* 9(33): 18835-18843.

Prathna TC, Chandrasekaran N, Raichur AM, Mukherjee A (2011) Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Coll Surf B Biointerfaces* 82: 152–159.

Qi L, Ma J, Shen J (1997) Radiation induced synthesis and characterization of copper nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science.* 186: 498–500.

Rai M, Ingle A (2012) Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 94: 287–293.

Rai M, Ingle AP, Pandit R, Paralikar P, Shende S, Gupta I, Biswas JK, Da Silva SS (2018) Copper and copper nanoparticles: Role in management of insect-pests and pathogenic microbes. *Nanotechnology Reviews* 7: 303–315.

ROSSMAN, A. Y.; MANAMGODA, D. S.; HYDE, K. D. Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae). **Taxon**, v.62, n.6, p. 1331–1332, 2013.

Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ (2007) O presente e o futuro da nanotecnologia: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1): 20-31.

Santiago ES, dos Santos JP, Cota LV, Guimaraes I, Guimaraes PDO, da Silva (2017) Incidência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em grãos de milho em fase experimental de desenvolvimento. In: Seminário De Iniciação Científica Pibic/Bic Júnior. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.

Servin A, Elmer W, Mukherjee A, De la Torre-Roche R, Hamdi H, White JC, Dimkpa C (2015) A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. Journal of Nanoparticle Research 17(2): 1-21.

Shoemaker RA. (1959). Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from '*Helminthosporium*'. Canadian Journal of Botany 37(5): 879-887.

Singh DP, Ojha AK, Srivastava ON (2009) Synthesis of different Cu(OH)₂ and CuO (nanowires, rectangles, seed-, belt-, and sheetlike) nanostructures by simple wet chemical route. The Journal of Physical Chemistry 113: 3409–3418.

Tullis EC (1935) Histological studies of rice leaves infected with *Helminthosporium oryzae*. Journal of Agricultural Research 50: 82-90.

Venancio WS, Rodrigues MAT, Begliomini E, Souza NL (2003) Physiological effects of strobilurim fungicides on plants. Publicatio UEPG – Ciência Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia 9(3): 59-68.

Vidhyasekaran P, Borromeo ES, Mew TW. (1992) *Helminthosporium oryzae* toxin suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization. Physiological and Molecular Plant Pathology 41(5): 307-315.

Villamizar-Gallardo R, Cruz JFO, Ortiz-Rodriguez OO (2016) Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 51(12): 1929-

1936.

Xiao JZ, Tsuda M, Doke N, Nishimura S (1991) Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. *Phytopathology* 81: 58–64.

Yadav L, Tripathi RM, Prasad R, Pudake RN, Mittal J (2017) Antibacterial activity of Cu nanoparticles against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Nano Biomedicine and Engineering* 9(1): 9-14.

Ypema HL, Gold RE (1999) Kresoxim-methyl: modifications of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83: 4-19.

TABELAS E FIGURAS

Tabela I. Análise de variância dos efeitos dos cultivares (C) e dos tratamentos (T; Controle, fungicida, NPs Cobre e NPs Prata) sobre a severidade, número de lesões por cm² (NL), tamanho

Fonte de variação ^a	Valores <i>F</i> ^b		
	Cultivar (C)	Tratamentos (T)	A × T
Severidade	2,57 ^{ns}	97,52***	0,48 ^{ns}
NL	2,07 ^{ns}	107,61***	1,09 ^{ns}
TL	0,16 ^{ns}	15,66***	0,22 ^{ns}
AACPD	11,33***	494,01***	1,42 ^{ns}

de lesão (TL) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

^a Efeito principal e interação entre os fatores cultivares (C; A70CL (suscetível), e os genótipos Tropical e Pampeira (moderadamente resistente a mancha parda) e os tratamentos (T; Controle, fungicida azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata).

^b Níveis de probabilidade: ns = não significativo, * = 0.05, ** = 0.01 e *** = 0.01.

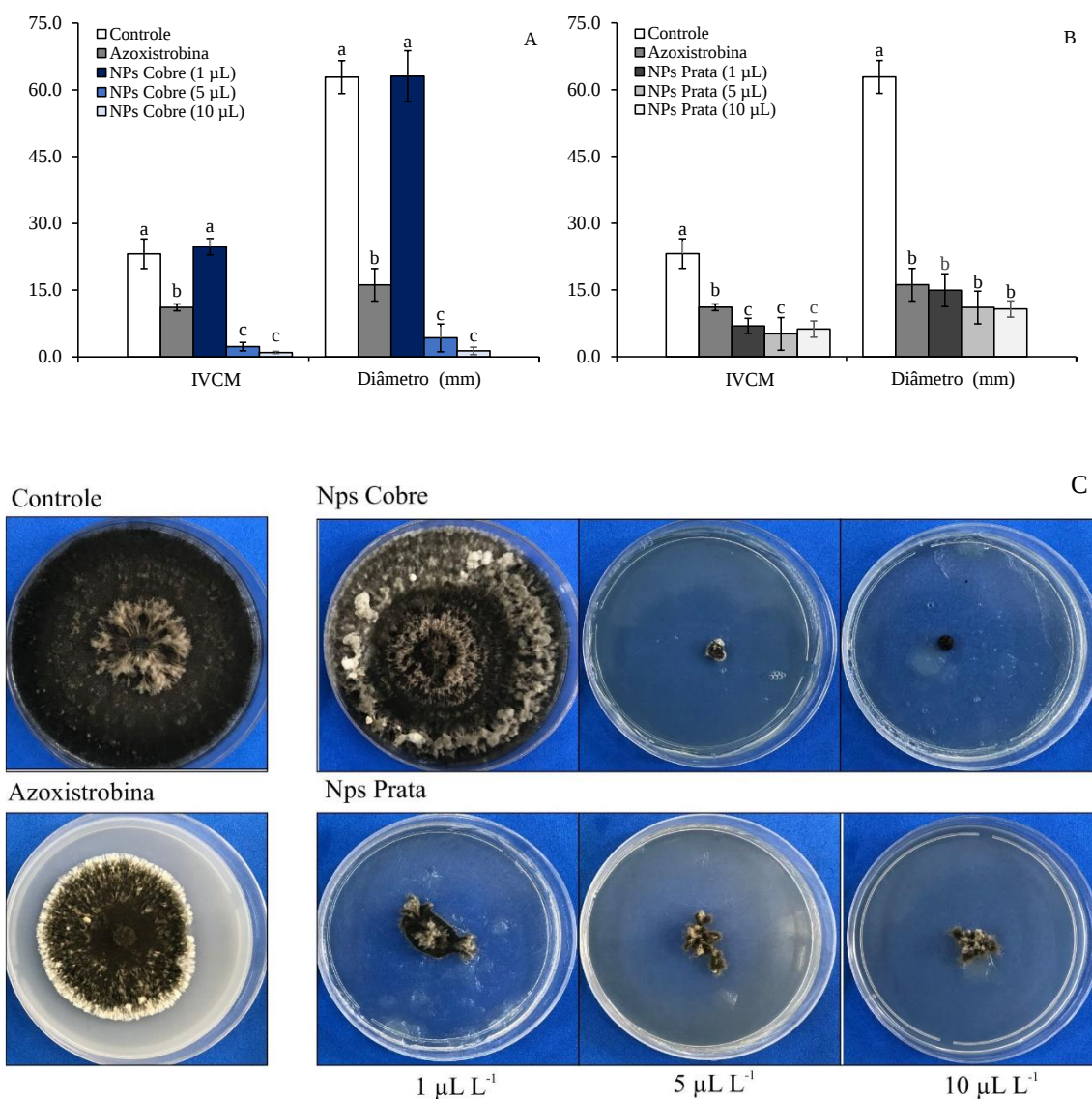


Figura I. Efeito de Nanopartículas (NPs) de cobre (A) e NPs de prata (B) sobre o índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro micelial (mm) de *Bipolaris oryzae*. Para cada variável, as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras indicam os desvios padrão das médias. $n = 10$.

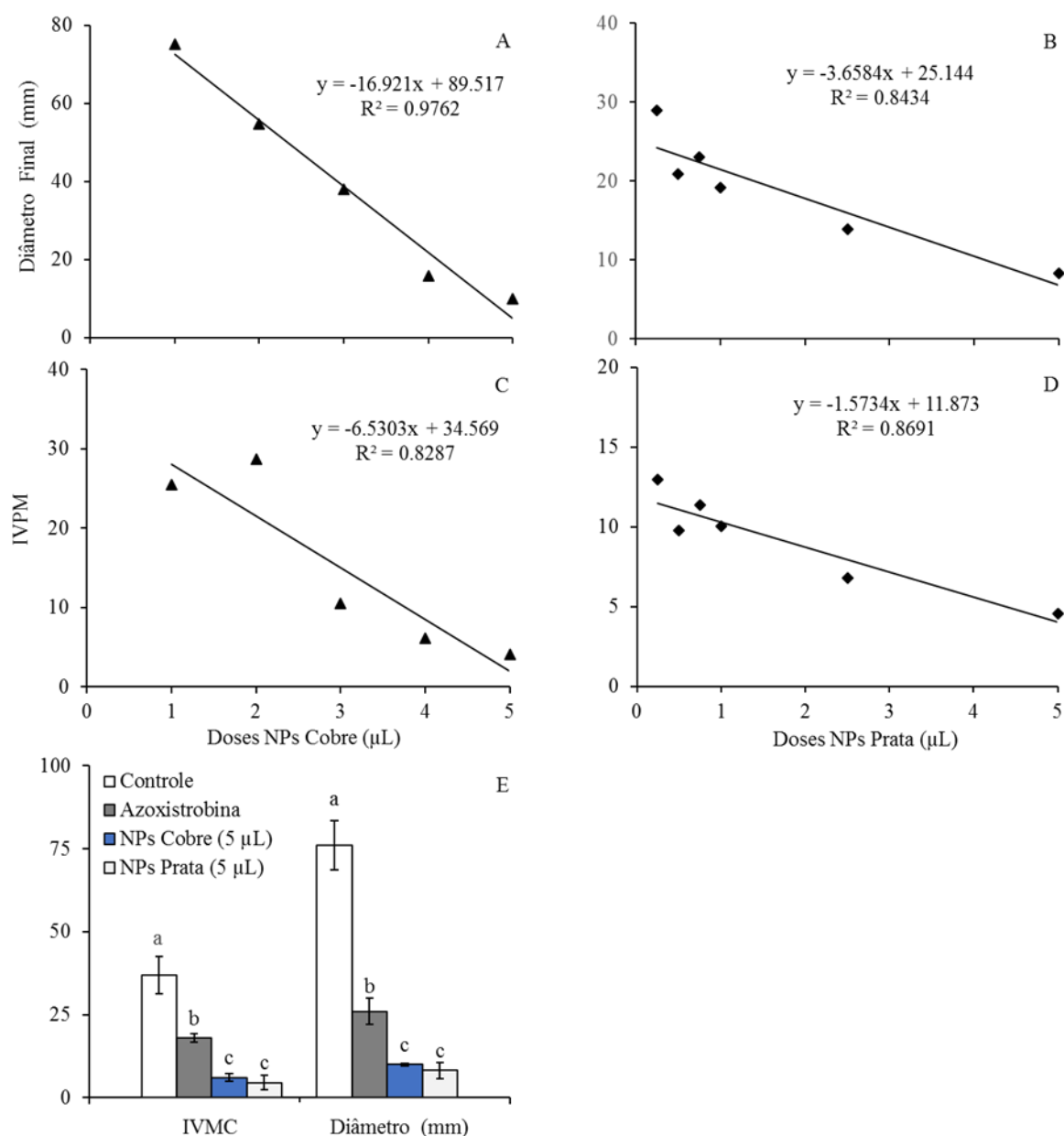


Figura II. Análise de regressão linear do efeito das doses crescentes das nanopartículas (NPs) de cobre (A e C) e NPs de prata (B e D) sobre diâmetro final (A e B) e o índice velocidade de crescimento micelial (IVCM) (C e D) de *Bipolaris oryzae*. Para cada variável (IVCM e diâmetro) (E), as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras indicam os desvios padrão das médias. R^2 = coeficiente de determinação, $n = 10$.

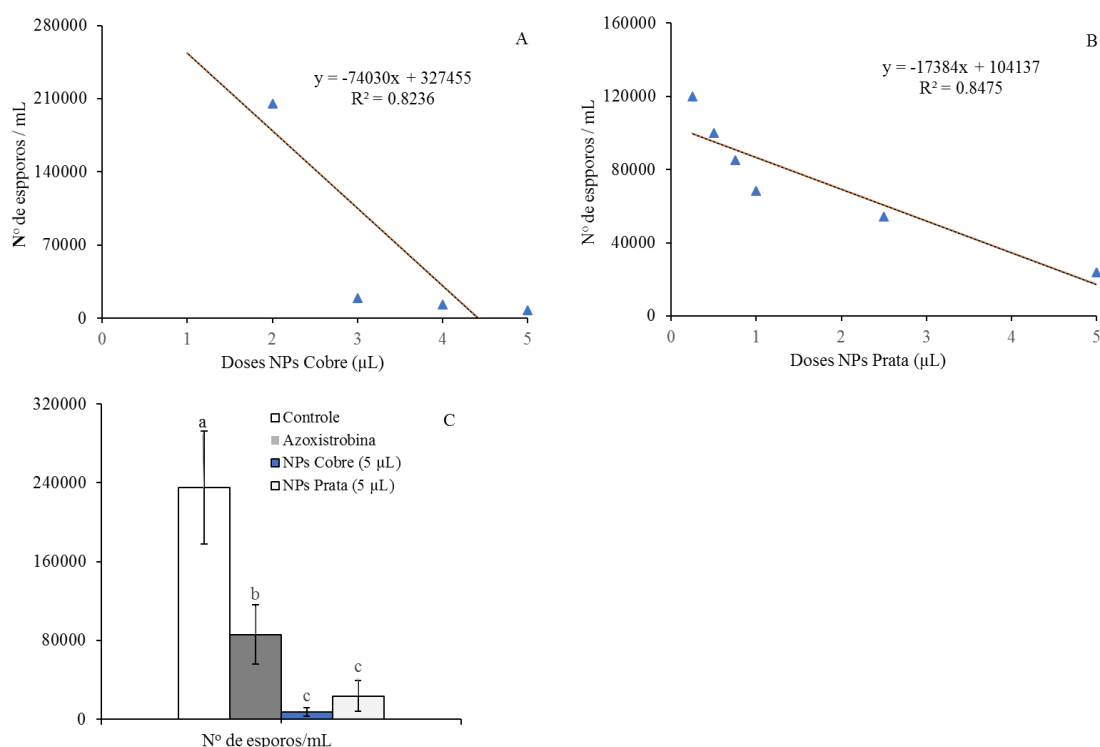


Figura III. Análise de regressão linear do efeito das doses crescentes das nanopartículas (NPs) de cobre (A) e NPs de prata (B) sobre o número (N°) de esporos de *Bipolaris oryzae* por mililitros (mL) (A e B). Para o N° de esporos/mL (C), as médias de cada tratamento que são seguidas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras indicam os desvios padrão das médias. R^2 = coeficiente de determinação, $n = 10$.

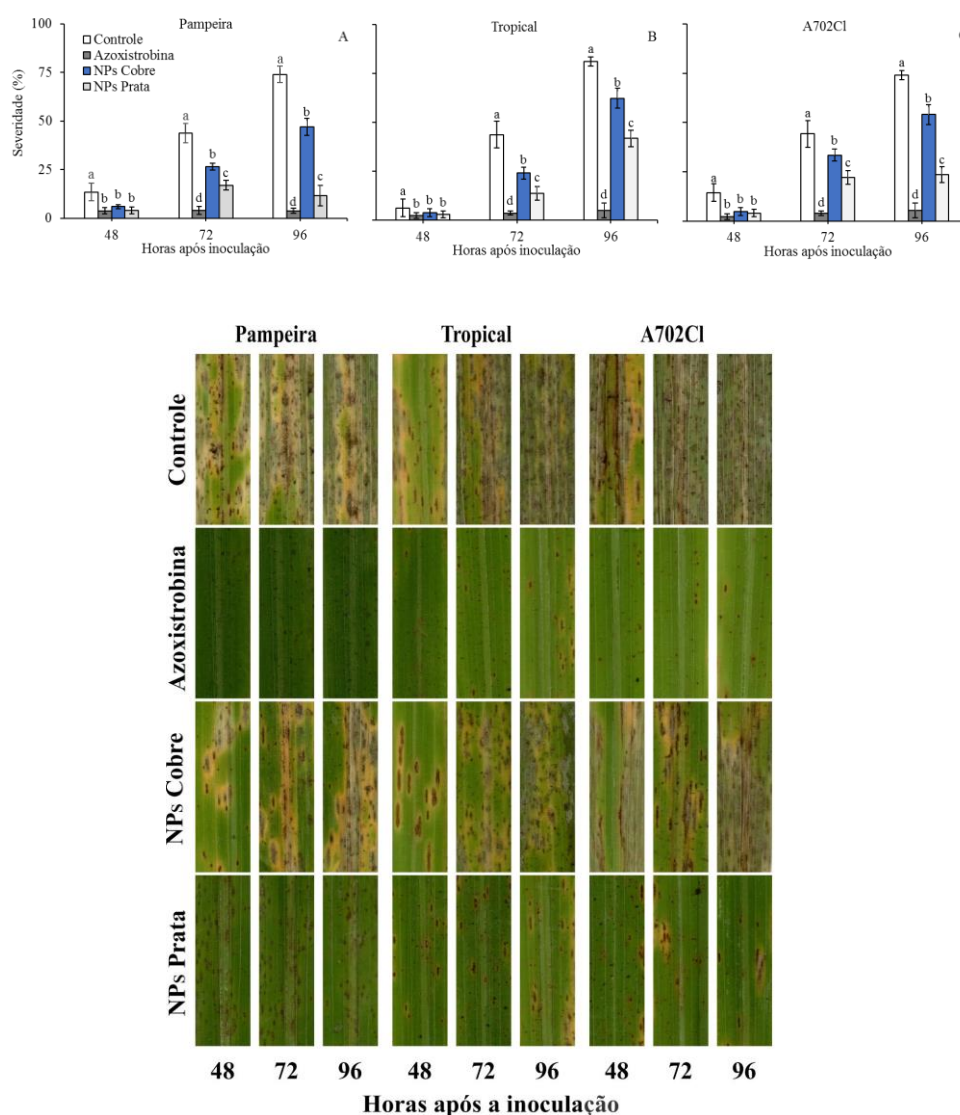


Figura 4. Severidade da mancha parda nos genótipos de arroz Pampeira (A), Tropical (B) e A702Cl (C) previamente pulverizados com água (controle), fungicida Azoxistrobina, NPs de Cobre ($5 \mu\text{L L}^{-1}$) e NPs de prata ($5 \mu\text{L L}^{-1}$). As médias dos tratamentos marcados com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam os desvios padrão das médias. $n = 10$

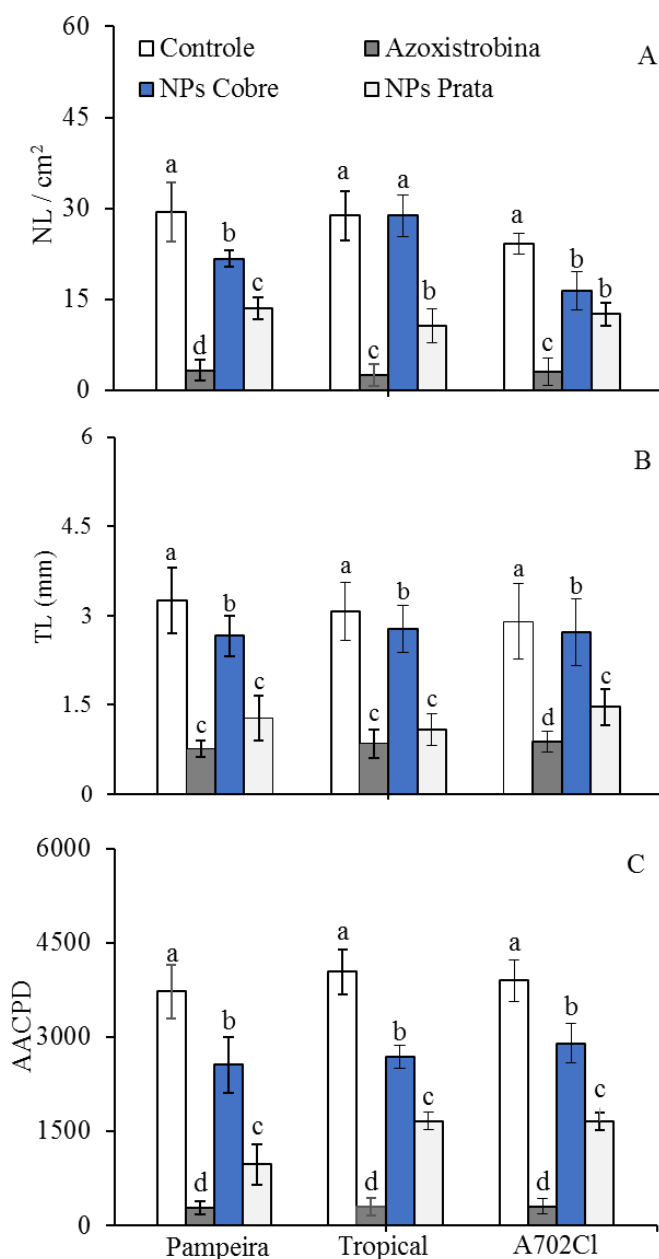


Figura 5. Número de lesões (NL) por cm² (A), tamanho de lesão (B) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (C) em genótipos de arroz Pampeira (A), Tropical (B) e A702Cl (C) previamente pulverizados com água (controle), fungicida Azoxistrobina, NPs de Cobre (5 µL L⁻¹) e NPs de prata (5 µL L⁻¹). As médias dos tratamentos marcados com letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. As barras representam os desvios padrão das médias. n = 10.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

Para todos os testes *in vitro*, os ajustes de regressão linear para o índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro micelial e número de conídios de *B. oryzae* demonstraram uma redução destes parâmetros a medida que as doses de NPs de prata e NPs de Cobre aumentaram.

A área abaixo da curva de progresso da doença foi significativamente reduzida em 92, 31 e 33 % para Pampeira, 92, 25 e 57 % para A702Cl e 92, 33 e 58 % para Tropical, respectivamente, para os tratamentos com azoxitrobina, NPs Cobre e NPs Prata em comparação com o tratamento controle. Esta mesma tendência de redução foram observadas para os demais componentes de resistência como a severidade final, tamanho de lesão e número de lesões por cm².

Os resultados do presente estudo demonstraram a eficiência das NPs de cobre e, principalmente, NPs de prata no controle de MP do arroz.