

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LARISSA ZUBEK

Resposta de defesa vegetal em plantas de soja, controle de mofo branco e atividade antifúngica *in vitro* em *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando prata coloidal, em doses ponderais e homeopáticas

Maringá
2018

LARISSA ZUBEK

Resposta de defesa vegetal em plantas de soja, controle de mofo branco e atividade antifúngica *in vitro* em *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando prata coloidal, em doses ponderais e homeopáticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Co-Orientador: Carlos Moacir Bonato.

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Z93r Zubek, Larissa
Resposta de defesa vegetal em plantas de soja, controle de mofo branco e atividade antifúngica *in vitro* em *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando prata coloidal, em doses ponderais e homeopáticas / Larissa Zubek. -- Maringá, 2018.

34 f.: il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof.^a Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal, 2018.

1. Mofo branco. 2. Gliceolina. 3. Homeopatia. I. Schwan-Estrada, Kátia Regina Freitas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Área de Concentração: Produção de Vegetal. III. Título.

CDD 21.ed.632.4

AHS - CRB 9/1065

FOLHA DE APROVAÇÃO

LARISSA ZUBEK

Resposta de defesa vegetal em plantas de soja, controle de mofo branco e atividade antifúngica *in vitro* em *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando prata coloidal, em doses ponderais e homeopáticas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2018.

Prof^a. Dr^a Kátia Regina Freitas Schwan Estrada
Presidente

Prof. Dr Carlos Moacir Bonato
Membro

Prof^a. Dr^a Solange Maria Bonaldo
Membro (vídeo conferência)

Prof. Dr José Renato Stangarlin
Membro (vídeo conferência)

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai a Deus, doador de todos os dons.

Agradeço a minha família, minha mãe Maria Luiza dos Santos Zubek, meu pai Juil Zubek e meu irmão Yuri Zubek por serem exemplo e apoio incondicional.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada pela confiança e auxílio.

Agradeço ao meu co-Orientador Prof Dr Carlos Moacir Bonato pelo carinho e por ter me apresentado a homeopatia.

Ao meu querido Heraldo Takao Hashiguti, pelo cuidado e companheirismo.

Aos meus colegas de laboratório que foram parte essencial nesse trabalho.

A todos os professores e técnicos que auxiliaram na confecção do trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Resposta de defesa vegetal em plantas de soja, controle de mofo branco e atividade antifúngica *in vitro* em *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando prata coloidal, em doses ponderais e homeopáticas

RESUMO

A prata coloidal é usada nos mais variados ramos da indústria devido a seu conhecido poder antimicrobiano. Estudos têm sido feitos almejando sua utilização na agricultura tendo em vista seu amplo espectro e sua ação em baixas concentrações. Porém, para que seja usada na agricultura com segurança são necessários estudos também sobre seu efeito sobre as plantas e no ecossistema. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco, causa graves prejuízos na cultura da soja. Não existem variedades com resistência completa a doença, além disso, o fato do fungo possuir vários hospedeiros e gerar estruturas de sobrevivência configura-o como sendo de difícil manejo. Tendo em vista essa dificuldade torna-se interessante a inserção de novas técnicas que possam auxiliar em seu manejo, dentre elas o uso de homeopatia e a indução de resistência. Deste modo o objetivo desse trabalho foi avaliar os possíveis efeitos deletérios da prata coloidal às plantas de soja e à sua nodulação bem como os efeitos *in vitro* da prata coloidal e preparados homeopáticos de prata coloidal no fungo *S. sclerotiorum*, na indução de gliceolina em cotilédones de soja e na indução de resistência a *S. sclerotiorum* em plantas de soja. No primeiro experimento testaram-se as concentrações 0, 14,64 mg L⁻¹, 2,28 mg L⁻¹, 43,92 mg L⁻¹ e 58,57 mg L⁻¹ de prata coloidal na irrigação de plantas de soja e avaliou-se biomassa fresca, comprimento da parte aérea e da raiz da planta, número e biomassa fresca dos nódulos e teor de clorofilas a, b e totais. Em nenhum dos parâmetros avaliados foi encontrado diferença significativa em relação à testemunha. Os demais ensaios foram divididos em dois experimentos, um com as doses ponderais (não homeopáticas) usando 0,58 mg L⁻¹, 1,17 mg L⁻¹, 1,75 mg L⁻¹, 2,34 mg L⁻¹ e 2,92 mg L⁻¹ de prata coloidal e outro com as dinamizações 6, 12, 18, 24 e 30CH (Centesimal Hahnemanniana) do medicamento homeopático feito a partir da prata coloidal. O segundo trabalho avaliou o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e viabilidade de escleródios na presença dos tratamentos. Em todas as concentrações a prata coloidal atrasou o desenvolvimento do fungo e quanto às doses homeopáticas as dinamizações 12 e 18CH estimularam o crescimento do fungo. Nenhum dos tratamentos influenciou na germinação carpogênica dos escleródios. Na avaliação da gliceolina todas as concentrações da prata coloidal foram superiores a testemunha e a dinamização homeopática 18CH também foi superior à testemunha. Nos experimentos que avaliaram a indução de resistência a *S.*

sclerotiorum as concentrações 1% e 3% da prata coloidal atrasaram o desenvolvimento da doença até o 4º dia após a inoculação, porém, nas demais avaliações, nenhuma das concentrações diferiu da testemunha. No experimento com os medicamentos homeopáticos a avaliação realizada no 4º dia após a inoculação apenas o 30CH não diferiu da testemunha e os demais tratamentos apresentaram menor comprimento da lesão. Nas avaliações posteriores todos os medicamentos homeopáticos foram melhores que a testemunha. A prata coloidal, tanto na forma ponderal quanto homeopática tem potencial para a utilização no manejo de *S. sclerotiorum* na cultura da soja.

Palavras-chave: Mofo branco, Gliceolina, Homeopatia.

Response of plant defense in soybean plants and in vitro antifungal activity in *Sclerotinia sclerotiorum* using colloidal silver, in allopathic and homeopathic doses

ABSTRACT

Colloidal silver is used in the most varied branches of the industry due to its known antimicrobial power. Studies have been done aiming at its use in agriculture in view of its broad spectrum and its action in low concentrations. However, for that to be used safely in agriculture, studies are also needed on its effect on plants and the ecosystem. The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of white mold, causes serious damages in the soybean crop. There are no varieties with complete resistance to disease, furthermore, the fact that the fungus has several hosts and generate resistance structures configures it as being difficult to control. In view of this difficulty, it is interesting to insert new techniques that may aid in its control, among them the use of homeopathy and the induction of resistance. The aim of this work was to evaluate the possible deleterious effects of colloidal silver on soybean plants and their nodulation as well as the effects of colloidal silver and colloidal silver homeopathic preparations on *S. sclerotiorum in vitro*, on induction of gliceolin in soybean cotyledons and induction of resistance to *S. sclerotiorum* in soybean plants. In the first experiment the concentrations 0, 14,64 mg L⁻¹, 2,28 mg L⁻¹, 43,92 mg L⁻¹ and 58,57 mg L⁻¹ of colloidal silver were tested in the irrigation of soybean plants and the fresh biomass, shoot and root length of the plant, number and biomass of nodules and the chlorophyll content a, b and total was evaluated. In none of the evaluated parameters a significant difference was found in relation to the control. The other trials were divided in two experiments one with the allopathic doses (non-homeopathic) using 0,58 mg L⁻¹, 1,17 mg L⁻¹, 1,75 mg L⁻¹, 2,34 mg L⁻¹ and 2,92 mg L⁻¹ of colloidal silver and another with the dynamizations 6, 12, 18, 24 and 30CH of the homeopathic medicine made from colloidal silver. The second work evaluated the mycelial growth of *S. sclerotiorum* and the viability of its sclerotium mass in the presence of treatments. At all concentrations the colloidal silver delayed the development of the fungus and in the homeopathic doses the dynamizations 12 and 18CH stimulated the fungus growth. None of the treatments influenced sclerotium mass germination. In the evaluation of glycerol all concentrations of colloidal silver were superior to control and the homeopathic dynamization 18CH was also superior to the control. In the trials that evaluated the induction

of resistance to *S. sclerotiorum* as concentrations 0,58 mg L⁻¹ and 1,75 mg L⁻¹ of the colloidal silver delayed the development of the disease until the 4th day after an inoculation, however in the other evaluations none of the concentrations differed from the control. In the experiment with the homeopathic medicines the evaluation performed on the 4th day after inoculation only the 30CH did not differ from the control and the other treatments had a shorter lesion length. In subsequent evaluations all homeopathic medicines were better than the control.

Keywords: White mold, glyceollin, Homeopathy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de nódulos e biomassa média dos nódulos de plantas de soja tratadas com prata coloidal em diferentes concentrações.....	16
Tabela 2 - Número de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na presença de prata coloidal em doses ponderais e homeopáticas quando adicionadas ao meio de cultura e tempo médio de germinação dos escleródios (TMG) gerados.	22
Tabela 3 - Comprimento das lesões (cm) no 4º, 8º e 12º dia após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de soja tratadas com prata coloidal, em doses homeopáticas e ponderais e inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inoculação de plantas de soja com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com método de ponteiros de 200 µL contendo discos de micélio.....	12
Figura 2 - Efeito das concentrações de prata coloidal na biomassa fresca (A) e no comprimento da parte aérea e da raiz de plantas de soja (B), cultivar NA 5909 RG Nidera. Maringá, UEM, 2017.	15
Figura 3 - Número de nódulos (A) e biomassa média dos nódulos (B) de plantas de soja tratadas com prata coloidal em diferentes concentrações. Maringá, UEM, 2017.	16
Figura 4 - Concentração de clorofila a, clorofila b e clorofilas totais em plantas de soja tratadas com diferentes concentrações de prata coloidal. Maringá, UEM, 2017.	18
Figura 5 - Efeito das doses ponderais (A) e dinamizações homeopáticas (B) de prata coloidal no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in vitro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).....	19
Figura 6 – Efeito das doses ponderais (A) e dinamizações homeopáticas (B) de prata coloidal no percentual de inibição do crescimento (PIC) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in vitro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).	20
Figura 7 - Produção de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja submetidos a doses ponderais (CV(%) 13,9) (A) e homeopáticas (CV(%) 16,8) (B) de prata coloidal. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3
2.2	Indução de Resistência	4
2.3	Homeopatia.....	5
2.4	Prata coloidal	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1	Preparo e determinação da concentração da prata coloidal	8
3.2	Preparo das homeopatias	8
3.3	Efeito da prata coloidal na planta e nodulação da soja.....	8
3.4	Experimento <i>in vitro</i> : inibição do crescimento micelial e viabilidade de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i>	9
3.5	Produção de gliceolina em cotilédones de soja	10
3.6	Experimento <i>in vivo</i> : Efeito de doses ponderais e homeopáticas no controle de mofo branco em soja.....	11
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1	Efeito da prata coloidal na planta e nodulação da soja.....	14
4.2	Ensaio <i>in vitro</i> : Inibição do crescimento micelial e viabilidade dos escleródios.	18
4.1	Produção de gliceolina em cotilédones de soja	22
4.2	Experimento <i>in vivo</i> : Efeito de doses ponderais e homeopáticas na indução de resistência	24
5	CONCLUSÕES.....	28
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de prata ou prata coloidal são conhecidas por suas propriedades antimicrobianas e tem sido amplamente utilizadas em vestuário, indústria alimentar, cosméticos e dispositivos médicos (GARNER; KELLER, 2014; SEGALA et al., 2015; THEOPHEL et al., 2014). Seu amplo espectro e sua eficiência em baixas concentrações têm levado também à pesquisa de sua utilização na agricultura, como fungicida, sendo inclusive alternativa para combater estirpes resistentes a fungicidas e bactericidas comerciais (KANHED et al., 2014; PULIT et al., 2013).

Para que a prata coloidal seja usada na agricultura com segurança é necessário que além dos estudos com fitopatógenos *in vitro*, investigue-se sua influência na planta, no solo e na microbiota como organismos de vida livre, bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos de solo e todos os seres vivos que afetam as características físico-químicas do solo e, por consequência, o equilíbrio e produtividade do ecossistema (ASHRAFI et al., 2013; ZHAI et al., 2016).

O agente causal do mofo branco, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um importante patógeno em várias culturas. Possui ampla distribuição geográfica e infecta muitas espécies de plantas, dentre elas várias plantas daninhas e muitas espécies de interesse econômico como alface, algodão, amendoim, canola, cebola, ervilha, feijão, girassol, soja entre outras. Em decorrência dessa ampla gama de hospedeiros e da sobrevivência do escleródio, estrutura de resistência do fungo, por longos períodos no solo, uma vez introduzido o patógeno em uma área, torna-se muito difícil sua erradicação (BARROS et al., 2015; MEYER et al., 2014).

Tendo em vista a dificuldade de controle dessa doença e a ausência de cultivares de soja com resistência completa a *S. sclerotiorum* no Brasil (JACCOUD FILHO et al., 2017) torna-se interessante agregar diferentes técnicas ao seu manejo sendo a indução de resistência uma das alternativas viáveis. Na indução de resistência o controle da doença se dá não pela ação direta de fatores antimicrobianos, mas sim, pela capacidade do indutor em ativar na planta mecanismos de defesa estruturais e, ou, bioquímicos latentes. A pesquisa de indutores de resistência é de grande importância para a diminuição da dependência de pesticidas químicos. Ela tem por objetivo proteger plantas que possuem naturalmente nível de resistência insuficiente para o controle de doenças, principalmente sob alta pressão do patógeno (MIORANZA et al., 2017; OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

A homeopatia é uma ciência idealizada pelo médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann, no século XVIII. Desde seus primórdios ela tem sido usada no tratamento de enfermidades em seres humanos. Porém, trabalhos vêm demonstrando seu efeito também em plantas, inclusive na indução de resistência (OLIVEIRA et al., 2014) e no controle de patógenos (TOLEDO et al., 2009). A terapia com o medicamento homeopático consiste em ministrar doses infinitesimais do medicamento ao doente, evitando intoxicação e estimulando sua reação orgânica (HAHNEMANN, 1984).

No Brasil, o uso da homeopatia na agricultura está regulamentado pela Instrução Normativa Nº 46 de Outubro de 2011, que autoriza seu uso na agricultura orgânica como prática de manejo de pragas e doenças (MAPA, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi obter melhor compreensão sobre o impacto potencial da prata coloidal na planta e na nodulação de soja. Além disso, verificar o potencial de doses ponderais da prata coloidal e dos preparados homeopáticos na inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, na indução de gliceolina em cotilédones de soja e o possível efeito como indutor de resistência em plantas de soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib) de Bary é um fungo fitopatogênico necrotrófico que atinge uma ampla gama de plantas. Pertence ao reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia* (MYCOBANK, 2018). Pode sobreviver longos períodos em decorrência da formação dos escleródios, estruturas de resistência formada por uma massa compacta de hifas que são produzidos pelo fungo. Os escleródios podem germinar e produzir micélios (miceliogenicamente) ou apotécios (carpogenicamente) dependendo das condições ambientais (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Na germinação miceliogênica ocorre à formação de micélio que invade os tecidos do hospedeiro, com temperatura ótima para a germinação miceliogênica de 15 a 25°C (SAHARAN; MEHTA, 2008). A germinação carpogênica se dá em condições de alta umidade por período de 10 a 20 dias e temperatura de 10 a 21°C (FERREIRA et al., 1979). O escleródio dá origem ao apotécio (corpo de frutificação), no qual são produzidas ascas, espécie de pacote no qual estão alojados os ascósporos (AGRIOS, 2005). A temperatura ótima para o desenvolvimento da doença está entre 15 a 25 °C, e alta umidade é imprescindível para a germinação do ascósporo (KOCH et al., 2007). Geralmente a infecção se inicia nas pétalas das plantas de soja, pois os ascósporos e o micélio proveniente do escleródio precisam de uma fonte de nutriente para conseguir formar o apressório e penetrar na planta (SAHARAN; MEHTA, 2008).

Por possuir uma ampla gama de hospedeiros não existem sintomas únicos que representem todas as plantas infectadas pelo patógeno. Geralmente as folhas apresentam lesões aquosas que se expandem em direção ao pecíolo e para dentro do caule. Quando a lesão se inicia no caule primeiro se observam manchas escuras ou aquosas, dependendo do hospedeiro. As lesões geralmente se desenvolvem em tecidos necróticos e rapidamente apresentam manchas brancas com aspecto cotonoso. Em alguns casos não há evidências externas do micélio, que afeta apenas os tecidos vasculares. A formação do escleródio se dá tipicamente dentro do tecido infectado, mas também pode se formar na superfície em situação de alta umidade (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O fungo pode ser disseminado de várias formas, por meio de sementes infectadas, implementos e máquinas, solo infestado, plantas invasoras hospedeiras, restos culturais e vento (SAHARAN; MEHTA, 2008).

O fungo tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes com exceção da Antártida (JACCOUD FILHO et al., 2017). Em pesquisas feitas na região centro-oeste do Brasil na cultura da soja, os pesquisadores chegaram a estimativa de 304,85 kg ha⁻¹ de perdas para cada 1.000 kg de grãos colhidos em uma lavoura com 45,5% das plantas infectadas (REIS; NASCIMENTO, 2011).

Não existem cultivares de soja com resistência completa a doença, assim, o manejo consiste em rotação de cultura, plantio direto, diminuição da população de plantas, ajuste da época de semeadura para que o florescimento não coincida com condições climáticas favoráveis ao fungo, nutrição adequada da planta, solarização, manejo da irrigação e controles químico e biológico (JACCOUD FILHO et al., 2017).

2.2 Indução de Resistência

A indução de resistência em plantas consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes por meio de infecção localizada por patógenos ou como resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos (como microrganismos viáveis ou inativados) ou fatores abióticos (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016)

Resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) designam os mecanismos pelos quais as plantas ativar mecanismos de defesa não apenas no local de indução, mas também em outros lugares, depois de ser exposto a um agente indutor. A SAR é ativada por infecção fúngica, bacteriana ou viral, desencadeia a liberação local de ácido salicílico, mobilização de um sinal transportado no floema, acúmulo de ácido salicílico e proteínas relacionadas à patogênese em tecidos distantes do local de infecção. O resultado é maior resistência em toda a planta às infecções subsequentes. A ISR é causada por bactérias rizosféricas não patogênicas. Envolve a síntese transitória de ácido jasmônico e etileno e a ativação transitória de respostas de defesa em tecidos distais (GURR; RUSHTON, 2005).

Dentre as vantagens da indução de resistência destaca-se o espectro amplo de sua ação, podendo ser efetiva em bactérias, fungos, vírus, nematoides e até mesmo insetos (MIORANZA et al., 2017; PIETERSE et al., 2014; VALLAD; GOODMAN, 2004) Além

disso, a ativação dos mecanismos de defesa da planta pode significar menos aplicações de fungicida ao longo do ciclo da cultura (GOZZO; FAORO, 2013).

2.3 Homeopatia

O princípio da homeopatia “semelhante cura semelhante” é muito antigo, remonta de Hipócrates no século V a.C. e quer dizer que a doença deve ser tratada com substância capaz de produzir sintomas que sejam semelhantes aos da própria doença. Porém foi o médico alemão Christian Friedrich Samuel Hahnemann, nascido em 1755 que colocando esse princípio em prática descobriu a ciência homeopática e estabeleceu suas bases (LOCKIE; GEDDES, 2001).

Apesar da homeopatia ter nascido como uma especialidade médica direcionada a seres humanos ela tem sido usada com êxito em animais e plantas. Nas palavras de Hahnemann “Se as leis da natureza que proclamo são verdadeiras, então podem ser aplicadas a todos os seres vivos” (BONATO, 2004).

Hahnemann não concordava com os métodos grosseiros praticados pela medicina da época que incluíam sangrias, purgativos e maciças doses de medicamentos que muitas vezes acabavam por ocasionar sérios efeitos colaterais, então o médico acabou abandonando a profissão e passou a dedicar-se a tradução de livros. Em 1790, quando traduzia o livro tratado de matéria médica do Dr. William Cullen, Hahnemann se deparou com a afirmação de que o quinino, substância extraída da quina, era um bom tratamento para malária devido as suas propriedades adstringentes. Grande conhecedor de química Hahnemann não pode concordar com a afirmação, pois sabia que existiam várias outras substâncias mais adstringentes que a quina e que não tinha qualquer efeito sobre a malária. Então decidiu estudar mais a fundo. Durante dias, ele tomou doses de quinino e anotou as reações de seu organismo. Para seu espanto começou a apresentar os mesmos sintomas da malária, porém, quando a administração de quinino era interrompida os sintomas também acabavam. Esse comportamento o intrigou tanto que ele resolveu testar com outras substâncias com isso confirmou a teoria de Hipócrates de que “semelhante cura semelhante” (LOCKIE; GEDDES, 2001).

A lei do semelhante é o primeiro princípio básico da homeopatia postulado por Hahnemann. Existem outros três, sendo eles: as doses infinitesimais. No início Hahnemann usava as substâncias diluídas, mas ainda contendo sua parte material, porém, com o tempo

observou que essas substâncias ainda causavam efeitos colaterais nos enfermos e passou a diluir cada vez mais e agitar os medicamentos. Percebeu que estes obtinham resultados cada vez melhores. Outro princípio é a experimentação em indivíduo são. Na homeopatia para se entender a ação de uma substância agindo sobre o organismo precisa-se testá-la em um indivíduo são, e observando os sintomas causados no indivíduo são, pode-se tratar o indivíduo enfermo. Por último o princípio do medicamento único. Ao individualizar o paciente e identificar quais são os seus sintomas, o médico homeopata busca encontrar um só medicamento que mais se assemelhe a enfermidade (PAULO, 2001).

Hahnemann acreditava que devia haver algum tipo de energia sutil dentro do corpo que reage às provocações dos medicamentos homeopáticos, habilitando-os a se curarem sozinhos. Essa energia foi denominada de força vital. Quando essa força é abalada por estresse, dieta pobre, falta de exercícios físicos, mudanças ambientais ou problemas hereditários a consequência é a doença, ou seja, os sintomas da doença são a manifestação externa da tentativa da força vital de compensar o desequilíbrio e estabelecer a ordem (LOCKIE; GEDDES, 2001).

Os primeiros relatos de experimentação em plantas datam de 1920, no Instituto de Biologia de Stuttgart na Alemanha. Orientados por Rudolf Steiner o casal Kolisko e Kolisko (1923) realizou centenas de ensaios com muitas espécies vegetais e cerca de 300 preparados homeopáticos (ANDRADE; CASALI, 2011). Atualmente muitos grupos de pesquisa, tanto no Brasil quanto no exterior vêm se dedicando a agrohhomeopatia e comprovando seu efeito nos mais diversos aspectos relacionados às plantas inclusive na síntese de metabólitos secundários (BONATO; PROENÇA; REIS, 2009), no controle de doenças (GAMA et al., 2015) e na indução de resistência (LORENZETTI; STANGARLIM, 2016).

2.4 Prata coloidal

A prata tem sido usada como medicamento e para preservação de alimentos por muitas culturas. Os gregos, romanos e egípcios usavam vasos de prata para armazenar água e outros líquidos e assim mantê-los puros. Também os pioneiros da costa oeste dos Estados Unidos enfrentavam problemas para manter sua água, que era armazenada em caixotes de madeira, livre de bactérias e algas. A solução encontrada foi colocar moedas de prata e cobre dentro dos recipientes e assim evitar a deterioração da água. Quando as bactérias foram reconhecidas como causadoras de doenças a prata passou a ser usada também por médicos que usavam nitrato de prata em fraturas expostas, úlceras cutâneas e feridas supuradas. As

pomadas de sulfadiazina de prata são usadas amplamente de forma tópica para evitar infecções em queimaduras na pele (HILL, 2009).

Os compostos de prata iônica e também sais de prata são mais tóxicos para os microrganismos do que a prata coloidal. O nitrato de prata, por exemplo, é usado como germicida e até foi usado como medicamento no passado, no entanto sabe-se que pode ser cáustico e irritante para os tecidos, não sendo por isso recomendada sua ingestão. A ingestão como medicamento da prata coloidal é muito utilizada por naturalistas, porém não é uma prática aceita pelo FDA (Food and Drug Administration). Ela tem sido vendida como suplemento mineral traço, porém sua necessidade na nutrição humana não está estabelecida cientificamente (HILL, 2009).

Quanto ao efeito deletério nos microrganismos acredita-se que a prata inativa algumas enzimas dos microrganismos ao se ligar a grupos reativos, o que resulta na precipitação e inativação de proteínas específicas. Ela pode reagir com grupos amino, carboxila, fosfatos e imidazol diminuindo a atividade da lactato desidrogenase, glutatona e peroxidase. A prata pode também formar complexos reversíveis com sulfidrila e histidinas na superfície da célula, o que impede o crescimento de bactérias e vírus. Esse é um efeito bacteriostático e pode ser revertido retirando a prata do meio. Outro efeito é a afinidade da prata com o DNA. Muitas pesquisas indicam a afinidade de prata e outros metais ao DNA e grupos tiol de bactérias e esporos bacterianos. Os íons de prata se ligam as bases nitrogenadas e formam ligações cruzadas causando a desnaturação por deslocar ligações de hidrogênio entre as purinas e pirimidinas adjacentes, evitando assim a replicação (THURMAN; GERBA, 1989).

Existem algumas formas diferentes de se obter a prata coloidal, por exemplo, por irradiação gama (LONG; WU; CHEN, 2007), irradiação de elétrons (BOGLE; DHOLE; BHORASKAR, 2006), redução química por agentes redutores inorgânicos e orgânicos (BÖNNEMANN; RICHARDS, 2001) e o método fotoquímico (MALLICK; WITCOMB; SCURRELL, 2004). O método utilizado neste trabalho foi o eletroquímico, a partir de eletrólise com eletrodos de prata (KHAYDAROV et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo e determinação da concentração da prata coloidal

Para obtenção do coloide foi utilizado o gerador de prata coloidal constituído de dois eletrodos feitos de prata metálica imersos em água (dispergente), submetidos a uma tensão de aproximadamente 20 V, durante 30 min. Da eletrólise gerada obteve-se a dispersão de prata coloidal.

Para determinar a quantidade de prata contida na dispersão três amostras de 5 ml foram colocados em tubos de digestão com 3 mL de HNO₃ 65% e 1 ml H₂O₂ 30%. As amostras passaram por digestão em bloco digestor por duas horas e meia a 170 °C, tempo necessário para que ficassem completamente translúcidas. Em seguida as amostras foram quantificadas em espectrômetro de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (Agilent 4200 MP-AES). A concentração média de prata obtida foi de 58,6 mg L⁻¹.

3.2 Preparo das homeopatias

As homeopatias foram preparadas no Laboratório de Fisiologia e Homeopatia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá - UEM. A escala escolhida para a preparação dos medicamentos foi a Centesimal Hahnemanniana (CH). Nos experimentos foram utilizadas as preparações homeopáticas de prata coloidal nas dinamizações 6, 12, 18, 24 e 30CH. A preparação do medicamento homeopático consiste em diluir e agitar o medicamento sucessivas vezes de acordo com a escala e o veículo é a substância inerte utilizada para fazer as diluições. Nos experimentos *in vivo* e fitoalexinas foi usado como veículo álcool etílico 70%, para melhor conservação do medicamento, porém, como o álcool tem efeito antimicrobiano para o experimento *in vitro* o veículo utilizado foi água de osmose reversa. Para a preparação do medicamento 1CH, a diluição respeita uma proporção de uma parte do princípio ativo, no caso a prata coloidal para 99 partes do veículo. Para a obtenção da homeopatia 1CH, 200 µL da prata coloidal foram adicionados em 19,8 mL do veículo, e a mistura então sucussionada por 100 vezes em dinamizador braço mecânico (Denise 50-Autic). Para se obter o medicamento em 2CH, uma alíquota de 200 µL do medicamento 1CH foi adicionada a 19,8 mL do veículo e sucussionada em braço mecânico. O mesmo procedimento foi feito até se obter a dinamização 30CH.

3.3 Efeito da prata coloidal na planta e nodulação da soja

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no laboratório de Fisiologia e Homeopatia da Universidade Estadual de Maringá. O delineamento foi inteiramente

casualizado com 4 repetições. As sementes (3 por vaso) de soja cultivar NA 5909 RG foram semeadas em vasos de 800 mL contendo 0,95 kg da mistura solo, areia e húmus (3:1:1 [v:v:v]), não esterilizado. Após 7 dias procedeu-se o desbaste das plântulas deixando-se apenas uma planta por vaso. Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. A prata coloidal foi adicionada nas concentrações; 14,64 mg L⁻¹, 29,28 mg L⁻¹, 43,92 mg L⁻¹ e 58,57 mg L⁻¹. A testemunha foi constituída de água osmose reversa. As plantas, desde a semeadura, receberam 100 mL dos tratamentos, de 48 em 48 horas. Após 53 dias, estando as plantas no estágio R2, de pleno florescimento (FEHR; CAVINESS, 1977), foram avaliados; o comprimento e biomassa fresca da parte aérea e da raiz, número e biomassa fresca dos nódulos, clorofilas **a**, **b** e clorofila total.

3.3.1 Clorofilas

Para a extração da clorofila um disco de 2 cm² foi retirado do terceiro trifólio de cada planta, e em seguida pesado e acondicionado em vidro âmbar com 10 mL de acetona (80%) e saturada com carbonato de cálcio. Quarenta horas depois, quando os discos estavam incolores, o extrato obtido foi filtrado em papel filtro. As leituras de absorvância das amostras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 470, 647 e 663 nm, em cubetas de vidro. A concentração de clorofilas a e b foram obtidas a partir das equações descritas por Lichtenthaler (1987).

3.4 Experimento *in vitro*: inibição do crescimento micelial e viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*

Nos ensaios *in vitro*, utilizou-se, no primeiro, as doses ponderais (não homeopáticas) e outro com as doses homeopáticas. Os dois ensaios foram em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos homeopáticos consistiram nas preparações de prata coloidal nas dinamizações 6, 12, 18, 24 e 30CH adicionadas no meio BDA fundente (batata-dextrose-ágar) e testemunha meio BDA sem aditivos.

No ensaio com doses ponderais, utilizou-se 0,58 mg L⁻¹, 1,17 mg L⁻¹, 1,75 mg L⁻¹, 2,34 mg L⁻¹ e 2,92 mg L⁻¹ de prata coloidal, e como testemunha meio BDA. Nos dois ensaios os erlenmeyers contendo meio de cultura BDA previamente preparado foram autoclavados e posteriormente receberam os tratamentos. A mistura foi agitada para garantir a homogeneização e em seguida vertida em placas de Petri (aproximadamente 20 mL em cada placa). Após a solidificação do meio procedeu-se a repicagem de discos de micélio (8 mm de

diâmetro) de *S. sclerotiorum* (colônia de três dias em BDA). As placas foram vedadas com filme plástico e acondicionadas em BOD com temperatura de 20 °C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento do micélio foi realizada medindo-se o diâmetro da colônia fúngica em dois sentidos opostos. A primeira avaliação foi realizada depois de 24 horas da repicagem. As medidas foram feitas de 12 em 12 h até que a testemunha atingisse 2/3 da placa, totalizando três leituras. A partir dos dados coletados calculou-se o Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991), conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991) e o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC). Sendo o $IVCM = \frac{\sum (D - Da)}{N}$, em que D é o diâmetro atual da colônia, Da o diâmetro da colônia do dia anterior e N o número de dias após a inoculação. E $PIC = \frac{(Dt - Df)}{Dt} * 100$, em que Dt corresponde ao diâmetro da testemunha e Df ao diâmetro do tratamento

Após trinta 30 dias da repicagem foram contados o número de escleródios em cada placa e realizado o teste de viabilidade dos escleródios. Para o teste de viabilidade os escleródios foram recolhidos das placas de petri e mergulhados por 30 segundos em solução de hipoclorito de sódio 2% e 30 segundos em água de osmose reversa. O processo foi repetido por três vezes (DELGADO, 2007). Os escleródios foram colocados em grupos de quatro em novas placas com meio BDA, sendo feitas quatro placas por tratamento. As placas foram acondicionadas em BOD a 20°C e fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram feitas a cada 12 horas até 96 horas, quando todos os escleródios estavam germinados. Ao fim do ensaio foi calculado o tempo médio de germinação dos escleródios, segundo a seguinte fórmula:

$TMG = \frac{\sum ni * ti}{\sum ni}$ em que ni é o número de escleródios germinados dentro de determinado intervalo de tempo (ti), expresso em horas.

3.5 Produção de gliceolina em cotilédones de soja

Dois experimentos foram realizados um com as doses ponderais e outro com as dinamizações homeopáticas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Alternativo e Indução de Resistência em Plantas a Patógenos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado sendo cada repetição representada por uma gerbox. A cultivar de soja utilizada foi NA 5909 RG, da Empresa Nidera.

No experimento com doses ponderais, os tratamentos foram 0,58 mg L⁻¹, 1,17 mg L⁻¹, 1,75 mg L⁻¹, 2,34 mg L⁻¹ e 2,92 mg L⁻¹ de prata coloidal, plugs de micélio do fungo *S. sclerotiorum* (colônia em meio BDA) e a testemunha água destilada. No experimento com doses homeopáticas os tratamentos foram as dinamizações 6, 12, 18, 24 e 30CH dos preparados homeopáticos de prata coloidal, plugs de micélio de *S. sclerotiorum* e solução hidroalcoólica 0,7% (mesma gradação alcoólica dos medicamentos) como testemunhas.

As sementes de soja foram semeadas em areia autoclavada e 10 dias após a semeadura os cotilédones foram coletados, lavados, pesados e distribuídos em gerbox forrados com duas folhas de papel *germitest* umedecido com água destilada. Na parte abaxial de cada cotilédone realizou-se um corte superficial onde foram aplicados 20 µL dos tratamentos. No tratamento com o fungo foram retirados plugs de micélio de colônia de *S. sclerotiorum* e colocados em contato com o corte no cotilédone. Foram feitas 5 repetições de cada tratamento, cada repetição contendo 4 cotilédones. As caixas gerbox foram acondicionadas em câmara BOD a 25 °C no escuro por 20 horas. Em seguida os cotilédones foram colocados em tubos falcon com 15 mL de água destilada e submetidos à agitação por 1 hora em mesa agitadora a 150 rpm para extração de gliceolina. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro em 285 nm e o teor de gliceolina nos cotilédones expresso em abs 285nm g.p.f.⁻¹, de acordo com a metodologia descrita por Ziegler e Pontzen (1982). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias submetidas ao teste estatístico Scott-Knott, ao nível de probabilidade de 5%.

3.6 Experimento *in vivo*: Efeito de doses ponderais e homeopáticas no controle de mofo branco em soja

Os experimentos foram conduzidos simultaneamente em câmara de crescimento no laboratório de Fisiologia e Homeopatia da Universidade Estadual de Maringá, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As sementes de soja, cultivar NA 5909 RG, da Nidera (três por vaso) foram semeadas em vasos de 0,8 L contendo 0,95 kg da mistura solo, areia e húmus (3:1:1 [v:v:v]). Após 7 dias procedeu-se o desbaste das plântulas deixando apenas 1 por vaso. Os vasos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25°C antes da inoculação e 20 °C depois da inoculação com fotoperíodo de 12 horas.

No primeiro experimento, foram estudadas as doses ponderais (não homeopáticas) da prata coloidal nas concentrações 0,58 mg L⁻¹, 1,75 mg L⁻¹ e 2,92 mg L⁻¹ mais duas

testemunhas que receberam água, testemunha ferida (TF) e testemunha não ferida (TÑF). Os tratamentos utilizados no segundo experimento foram as homeopantias de prata coloidal nas dinamizações 6, 12, 18, 24 e 30CH, solução hidroalcoólica 0,7% (SH) (mesma gradação alcoólica das homeopantias).

No primeiro experimento, utilizando as doses ponderais, foi realizada uma única aplicação dos tratamentos três dias antes da inoculação, estando às plantas no estágio V6, quinto trifólio aberto. Antes de fazer a aplicação fez-se um ferimento no terceiro trifólio (contando do ápice para a base da planta) com carvão ativado aplicando-o por toda a folha sendo friccionando com os dedos. Depois do ferimento lavou-se a folha com água abundante e procedeu-se a aplicação dos tratamentos sobre o tecido lesionado. Para verificar isoladamente o efeito da injúria foi mantida uma testemunha sem ferimento, que foi tratada apenas com água (TÑF).

No experimento com as homeopantias os tratamentos foram aplicados semanalmente desde o dia da sementeira, totalizando seis aplicações. As aplicações foram feitas na água de irrigação, na proporção de 5 mL L⁻¹ sendo o volume total aplicado por vaso de 100 mL até as plantas chegarem ao estágio V6

Em ambos experimentos, as plantas foram inoculadas no estágio V6 de acordo com a metodologia proposta por Kull et al. (2003) com modificações. A inoculação foi feita conforme Figura 1, onde as plantas tiveram sua haste cortada abaixo do primeiro trifólio completamente expandido. Com o auxílio de ponteiros de 200 µL foram retirados discos (0,8 cm de diâmetro) de micélio de *S. sclerotiorum* (colônia de três dias em meio BDA), que em seguida foram colocados encaixados nas hastes recém-cortadas, com o micélio em contato com o ferimento.

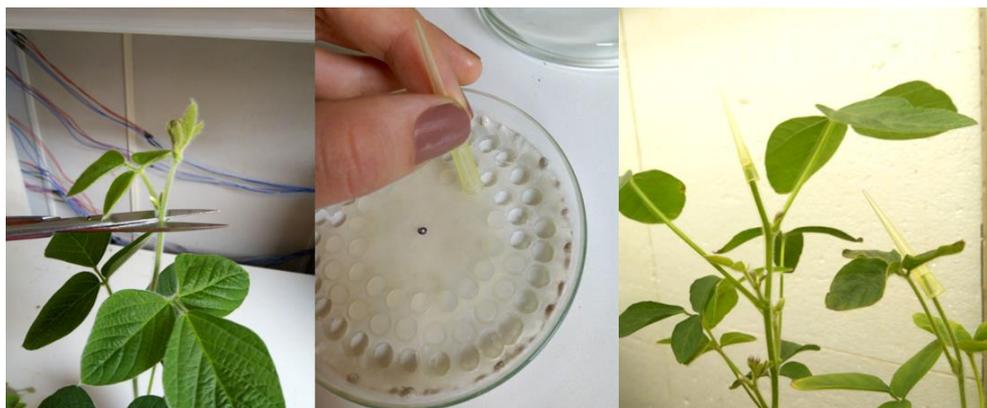


Figura 1 – Inoculação de plantas de soja com *Sclerotinia sclerotiorum* com método de ponteiros de 200 µL contendo discos de micélio.

As avaliações do comprimento da lesão (mm) iniciaram-se 24 horas após a inoculação, quando era possível observar a lesão causada pelo fungo e foram realizadas até o 12º dias após a inoculação. As avaliações de comprimento da lesão foram feitas com régua.

Com as leituras diárias do comprimento da lesão foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (CAMPBELL; MADDEN, 1990). $(AACPD) = \Sigma [(y1 + y2) / 2] * (t2 - t1)$, onde y1 e y2 são duas medidas consecutivas feitas nos tempos t1 e t2, respectivamente.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade, utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA, 2016).

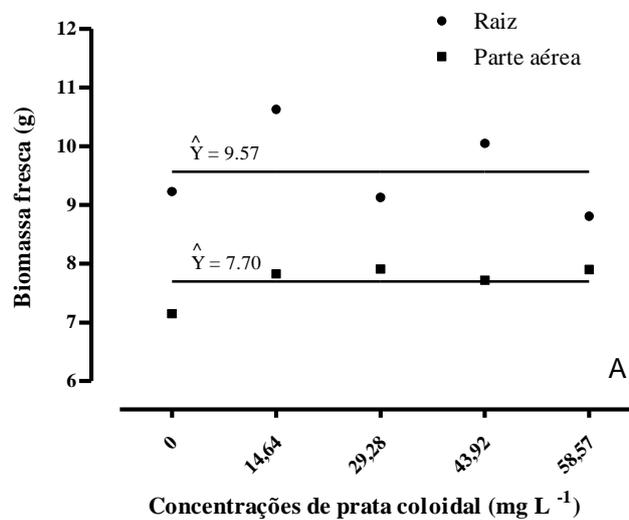
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da prata coloidal na planta e nodulação da soja

4.1.1 Biomassa fresca

A adição de concentrações crescentes de prata coloidal no solo do vaso não afetou significativamente a biomassa fresca da raiz e da parte aérea e o comprimento da raiz e da arte aérea das plantas de soja, quando comparado com a testemunha (Figura 2).

As variáveis biométricas são um indicativo importante de que as doses de prata coloidal foram inócuas as plantas, sendo este um resultado importante para a continuidade das pesquisas envolvendo a prata coloidal na indução de resistência e no controle de doença em plantas (Pias et al., 2016).



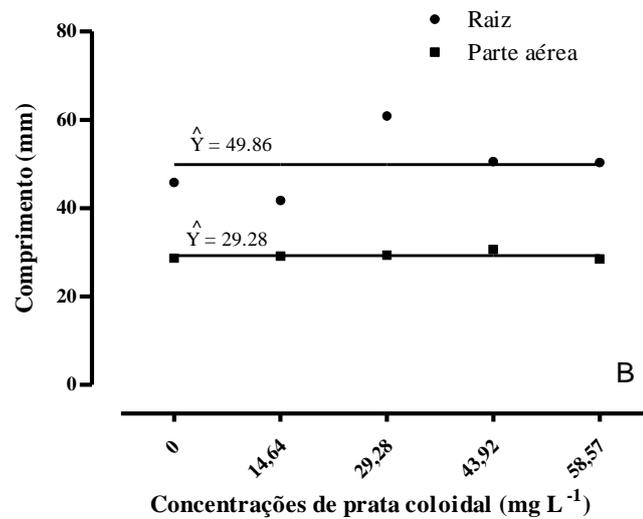


Figura 2 - Efeito das concentrações de prata coloidal na biomassa fresca (A) e no comprimento da parte aérea e da raiz de plantas de soja (B), cultivar NA 5909 RG Nidera. Maringá, UEM, 2017.

Alguns outros trabalhos também demonstram a ausência de efeitos negativos da prata coloidal em plantas. Mahdizadeh et al. (2015) trabalhou com melão e duas aplicações de prata coloidal na concentração de 6 mg L⁻¹. Ao fim do experimento, dois meses após a semeadura, observou que as plantas que receberam a prata coloidal e as que não receberam não diferiram na produção de biomassa fresca e seca da raiz e da parte aérea.

4.1.2 Nodulação

Na avaliação de quantidade de nódulos e biomassa média dos nódulos também não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Figura 2).

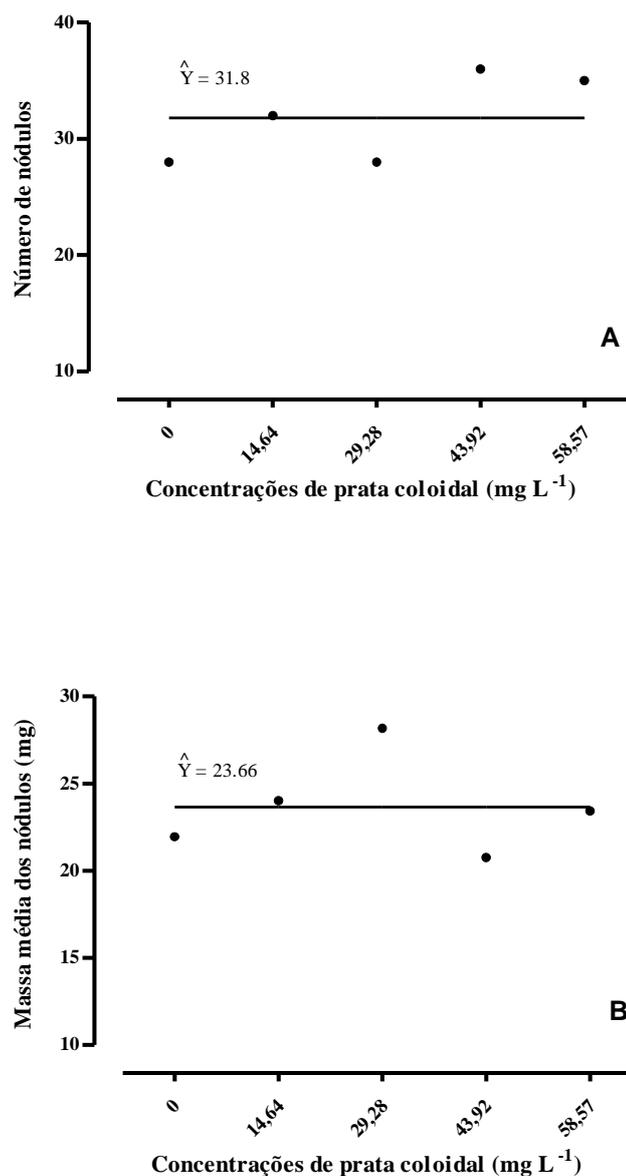


Figura 3 - Número de nódulos (A) e biomassa média dos nódulos (B) de plantas de soja tratadas com prata coloidal em diferentes concentrações. Maringá, UEM, 2017.

O nitrogênio é o nutriente que possui maior demanda pela planta de soja, sendo assim a fixação biológica de nitrogênio é um processo de suma importância uma vez que supre a necessidade do elemento. A fixação biológica na soja é realizada por bactérias do gênero *Rhizobium* que são bactérias endossimbiontes presentes no solo e formam estruturas especializadas nas raízes, os chamados nódulos (HUNGRIA et al., 2010). Tendo em vista a eficácia bactericida da prata coloidal investigada por muitos pesquisadores e seu potencial efetivo contra grande variedade de microrganismos temia-se prejuízo na nodulação das

plantas, porém, o resultado indicou que mesmo em doses elevadas, consideradas nocivas a vários microrganismos *in vitro* (MENDES et al., 2014; PULIT et al., 2013) e mesmo com aplicações frequentes a simbiose parece não ter sido afetada pela prata coloidal.

Ashrafi et al. (2013) obtiveram indiretamente resultados que corroboram a não interferência da prata coloidal no número e biomassa de nódulos das plantas de soja. Em seu experimento não encontraram diferença no teor de nitrogênio nos grãos produzidos pelas plantas de soja previamente tratadas com prata coloidal. As plantas tratadas foram ainda superiores em produtividade em relação a testemunha, demonstrando que a prata coloidal provavelmente não prejudicou a nodulação das plantas.

Por outro lado Schlich e Hund-Rinke (2015) investigaram a atividade da prata coloidal utilizando diferentes doses (0,56, 1,67, 5,0 e 1,5 mg L⁻¹) em cinco solos (com propriedades físico-químicas distintas) e verificaram inibição da atividade de bactérias oxidantes de amônia em alguns dos solos principalmente nas maiores concentrações de prata coloidal, sugerindo que diferente do observado nesse trabalho a microbiota foi prejudicada.

4.1.3 Clorofilas

As clorofilas a, b e totais também não diferiram em relação à testemunha (Figura 3), indicativo indireto de que a fixação de nitrogênio não foi prejudicada, pois sendo o N importante constituinte das clorofilas sua falta poderia acarretar na diminuição das clorofilas e consequente amarelecimento das plantas (TAIZ et al., 2017).

Alguns autores observaram incremento nas clorofilas ao utilizarem a prata coloidal como Salama (2012) em plantas de milho e feijão, em casa de vegetação. No experimento em questão foram aplicados nas plantas 15 mL de prata coloidal durante 12 dias em concentrações de 20 a 100 mg L⁻¹. O tratamento 60 mg L⁻¹ no feijão aumentou 49% o teor de clorofila a e 33% a de clorofila b. No milho houve aumento de 46 e 26% nas clorofilas a e b, respectivamente, em relação ao controle. Salama (2012) e Mehmood (2017) observaram também incremento no teor de carboidratos nos grãos das plantas tratadas.

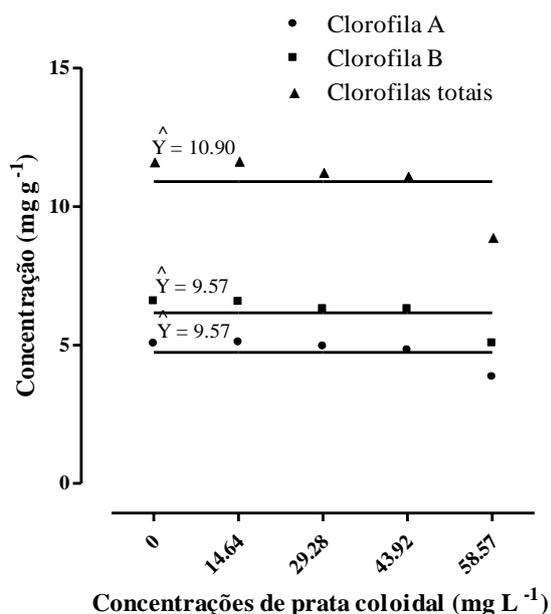


Figura 4 - Concentração de clorofila a, clorofila b e clorofilas totais em plantas de soja tratadas com diferentes concentrações de prata coloidal. Maringá, UEM, 2017.

Os resultados apresentados são um indicativo de que diferentes culturas e diferentes tipos de solo podem responder de forma diferente à presença da prata coloidal, e que dependendo da dose aplicada a prata coloidal, não só não oferece efeitos nocivos às plantas, como melhora seu rendimento (SCHLICH; HUND-RINKE, 2015).

4.2 Ensaios *in vitro*: Inibição do crescimento micelial e viabilidade dos escleródios

Na avaliação do crescimento micelial com dose ponderal de prata foi possível observar que o crescimento do fungo foi influenciado pela presença da prata coloidal no meio. Observa-se, pelo IVC, atraso no crescimento do fungo em todas as concentrações da prata coloidal (Figura 4).

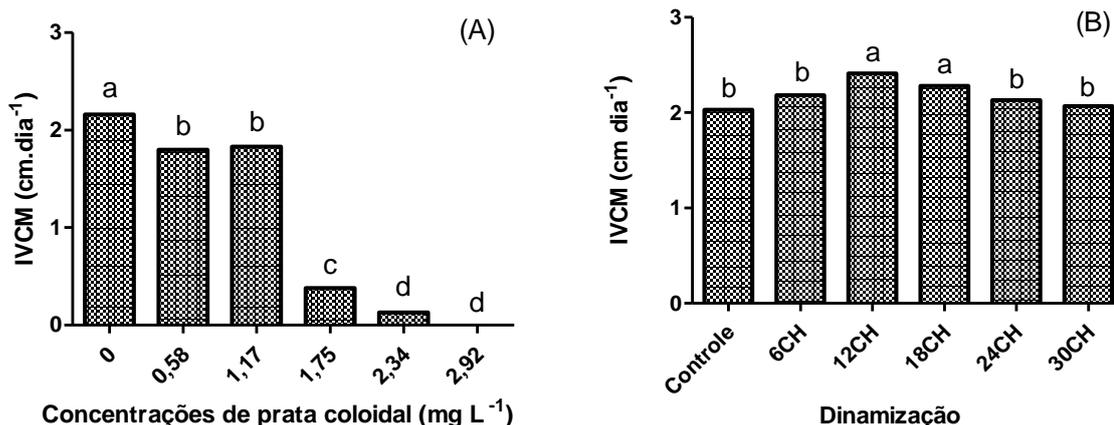


Figura 5 - Efeito das doses ponderais (A) e dinamizações homeopáticas (B) de prata coloidal no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).

Na inibição do crescimento (PIC), os tratamentos 0,58 mg L⁻¹ e 1,17 mg L⁻¹ foram semelhantes e superiores a testemunha com 15,6 e 17,4% de inibição respectivamente. O tratamento 1,75 mg L⁻¹ foi superior a estes com 83,5% de inibição e os melhores resultados foram obtidos com as concentrações 2,34 mg L⁻¹ e 2,92 mg L⁻¹. O tratamento 2,34 mg L⁻¹ obteve 94,0% de inibição enquanto o 2,92 obteve inibição de 100% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

Outros trabalhos demonstram a atividade da prata coloidal contra fungos fitopatogênicos. Kim et al. (2012) obtiveram resultado semelhante ao obtido nesse trabalho utilizando três pratas coloidais comerciais, com as quais avaliaram a inibição do crescimento micelial de 14 espécies de fungo de grande importância agrônômica. Os produtos foram testados nas concentrações de 25, 50 e 100 mg L⁻¹ incorporados ao meio de cultura. Apesar da grande variabilidade do grau de inibição entre os fungos, todas as espécies apresentaram atraso no crescimento micelial, em pelo menos uma concentração, alguns chegando a 100% de inibição.

O efeito da prata coloidal nos microrganismos é muito conhecido, no entanto, seu mecanismo ainda não foi completamente elucidado. Morones et al. (2005) observaram efeito na superfície da membrana da bactéria *Escherichia coli* alterando a permeabilidade e a respiração. Também foi observado que dentro da célula bacteriana a prata coloidal

possivelmente interaja com compostos que contenham enxofre e fósforo como o DNA, alterando suas funções. Outra hipótese é de que a prata coloidal interage fortemente com grupos tióis de enzimas vitais inativando-as (SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004).

Villamizar-gallardo (2016) observando efeito da prata coloidal em colônias fúngicas em microscópio eletrônico de varredura constatou que na concentração 50 mg L⁻¹ foi possível observar pequenas alterações na estrutura micelial, caracterizadas pela deformação da hifas em *Fusarium solani* e pela diminuição das estruturas reprodutivas em *Aspergillus flavus*.

No IVCM , as dinamizações homeopáticas 12 e 18CH proporcionaram velocidade de crescimento maior que a testemunha. No PIC (Figura 5) as dinamizações 12 e 18CH diferiram da testemunha incrementando 13,9 e 11,1%, respectivamente o diâmetro da colônia na última leitura.

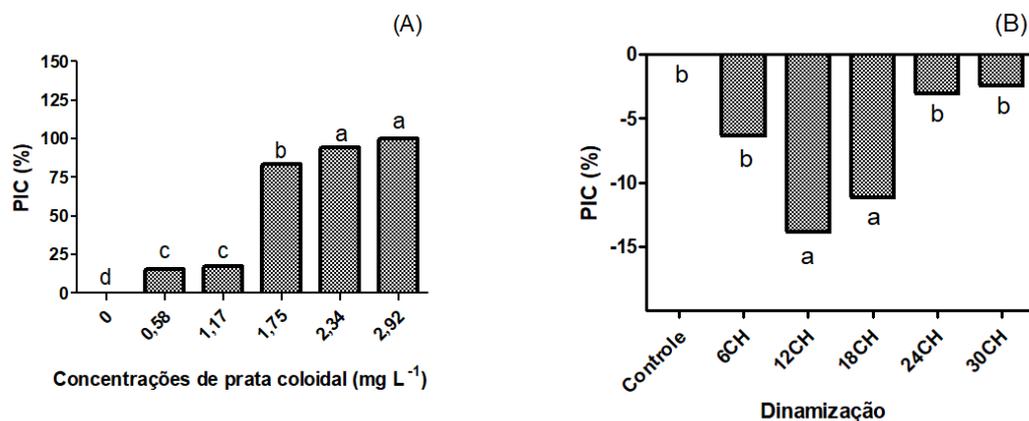


Figura 6 – Efeito das doses ponderais (A) e dinamizações homeopáticas (B) de prata coloidal no percentual de inibição do crescimento (PIC) de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).

Toledo et al. (2016) também observaram aumento no crescimento micelial de *Alternaria solani* em algumas dinamizações utilizando medicamentos homeopáticos. As dinamizações 12 e 60CH de *Propolis*, 6CH do isoterápico (homeopático feito com próprio fungo) e 12 e 30CH do medicamento obtido a partir da cinza das folhas do tomateiro

infectado com o fungo diferiram da testemunha solução hidroalcoólica, tendo o parâmetro diâmetro da colônia sido maior nas homeopantias do que na testemunha.

Apesar de apresentar efeito supressor no fungo nas doses ponderais, nas doses homeopáticas a prata coloidal estimulou o crescimento nas dinamizações 12 e 18CH. Tal comportamento é comum em medicamentos homeopáticos. Muitos dos policrestos, medicamentos utilizados com frequência na prática clínica, são tóxicos em doses ponderais. Um exemplo é o medicamento *Aconitum napellus*, a planta homônima do medicamento, da qual se extrai a tintura mãe, era usada ao longo da história como veneno para flecha de caça, ou o medicamento *Lachesis*, feito com o veneno da cobra surucucu (LOCKIE; GEDDES, 2001).

Quanto às avaliações dos escleródios, tanto no experimento com doses ponderais quanto no experimento com doses homeopáticas não foi observada diferença entre os tratamentos, nem na avaliação do número de escleródios e nem na avaliação de tempo médio de germinação e todos os tratamentos apresentaram 100% dos escleródios viáveis (Tabela 1). Foi observado que após o tempo de avaliação do crescimento micelial, em todos os tratamentos, o micélio do fungo cresceu ocupando toda a placa de Petri. A produção de escleródios ocorreu em todos os tratamentos e na avaliação de número de escleródios nenhum tratamento diferiu da testemunha. O tratamento com 2,92 mg L⁻¹ de prata coloidal, que no período de avaliação inibiu 100% do crescimento micelial, após avaliação apresentou crescimento do micélio e posterior produção de escleródios viáveis semelhantemente a testemunha. Esse resultado pode indicar que ocorra degradação da prata coloidal com o tempo.

Tabela 1 - Número de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de prata coloidal em doses ponderais e homeopáticas quando adicionadas ao meio de cultura e tempo médio de germinação dos escleródios (TMG) gerados.

Tratamento (mg L ⁻¹)	Número de Escleródios	TMG (h)
0	8,75 ⁽¹⁾	63,00
0,58	9,50	61,50
1,17	7,50	60,00
1,75	11,25	49,50
2,34	8,00	60,00
2,92	5,50	52,50
CV(%)	25,44	11,81
Testemunha	8,75	63,00
6CH	9,25	55,50
12CH	7,25	54,00
18CH	8,00	55,50
24CH	6,00	69,00
30CH	8,25	67,50
CV(%)	26,13	15,83

(1) De acordo com o teste F não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade.

4.1 Produção de gliceolina em cotilédones de soja

A produção de fitoalexinas parece ser um mecanismo comum de resistência a microrganismos fitopatogênicos em uma ampla gama de plantas. Estes compostos constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, com forte atividade

antimicrobiana e que se acumulam em resposta a estresses físicos, químicos e biológicos. As fitoalexinas em geral são indetectáveis na planta antes da infecção, mas são sintetizadas rapidamente após o ataque microbiano (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

No experimento com as doses ponderais todas as concentrações de prata coloidal incrementaram a produção de gliceolina quando comparado com a testemunha (Figura 6). O tratamento com o patógeno também causou maior acúmulo que a testemunha sendo semelhante estatisticamente a concentração 0,58 mg L⁻¹ de prata coloidal.

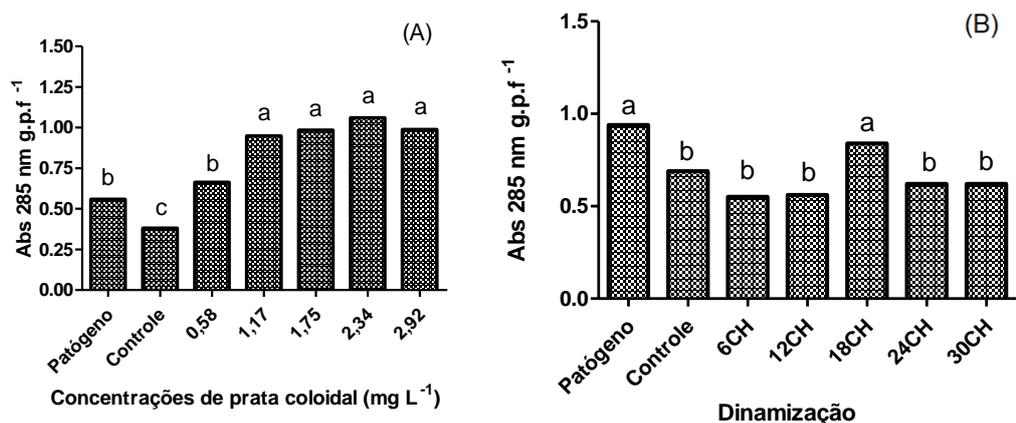


Figura 7 - Produção de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja submetidos a doses ponderais (CV(%) 13,9) (A) e homeopáticas (CV(%) 16,8) (B) de prata coloidal. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).

Tendo as doses de prata coloidal causado acúmulo de gliceolina maiores que o patógeno no experimento in vitro feito em cotilédones de soja é possível inferir que em uma infecção natural no campo sua aplicação proporcionaria vantagens competitivas a planta na defesa contra o patógeno. Esse resultado mostra que a prata coloidal pode não ter apenas ação direta no microrganismo, mas também agir como elicitador na planta desencadeando respostas locais de defesa maiores que as causadas pelo patógeno.

No experimento com as doses homeopáticas o acúmulo de gliceolina foi maior que a testemunha na dinamização 18CH da prata coloidal, sendo esta semelhante ao tratamento com o patógeno (Figura 6). Este resultado é corroborado por Oliveira et al. (2011), que observaram aumento da fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijão utilizando o medicamento *Calcareo carbonica* nas dinamizações 12, 24, 30 e 60CH e por Lorenzetti e Stangarlin (2016) que

observaram acréscimo de 85% e 166% na gliceolina utilizando respectivamente os medicamentos *Sulphur* e *Sepia*. Outros compostos secundários também têm sido alterados nas plantas pela aplicação de homeopáticos, como óleos essenciais (BONATO et al., 2009), revelando sua ação no metabolismo vegetal incrementando ou reduzindo compostos bioativos importantes. Tais resultados são um indicativo de que os medicamentos homeopáticos podem ser importantes alternativas no manejo de doenças em plantas.

4.2 Experimento *in vivo*: Efeito de doses ponderais e homeopáticas na indução de resistência

No experimento com doses ponderais foram utilizadas duas testemunhas, a Testemunha ferida (TF), que recebeu ferimento com abrasivo anteriormente a aplicação de água, assim como feito com os demais tratamentos, e a testemunha não ferida (TÑF) que apenas recebeu aplicação de água. A função da testemunha não ferida foi separar o efeito do ferimento do efeito do tratamento. Na avaliação realizada no 4º dia após a inoculação (Tabela 3), os tratamentos com as doses ponderais 0,58 mg L⁻¹ e 1,75 mg L⁻¹ apresentaram tamanho de lesão estatisticamente menores que a TF (testemunha ferida). Com esse resultado é possível inferir que as concentrações 0,58 mg L⁻¹ e 1,75 mg L⁻¹ tiveram ação elicitoras na planta, porém sua ação é de, no máximo, 4 dias pois a partir disto, não se observou diferença entre os tratamentos e a testemunha ferida (TF). Nas demais avaliações e na AACPD todas as concentrações de prata coloidal e a TF diferiram da TÑF (Tabela 2) indicando a possibilidade de que o ferimento feito na folha por si só pôde provocar resposta de defesa na planta. O estresse mecânico causado na folha pode ocasionar eventos relacionados a SIR (resistência sistêmica induzida) que envolvem um aumento transitório de etileno e ácido jasmônico levando ao desencadeamento de mecanismos bioquímicos de resistência (GURR e RUSHTON, 2005). As plantas, em seu ambiente, com frequência são acometidas por danos causados por areia, vento, chuva e granizo, danos estes que podem ser sítios de infecção para agentes patogênicos, por isso elas se valem de estratégias de defesa ao detectarem injúrias físicas. (REYMOND et al., 2000).

Nos tratamentos com doses homeopáticas, no 4º dia após a inoculação foi possível perceber diferença entre a testemunha e os medicamentos homeopáticos sendo que todos os medicamentos com exceção do 30CH foram estatisticamente superiores à testemunha, chegando a ter lesões 37% (6CH) menores. Nas avaliações do oitavo e décimo segundo dia, o

medicamento 30CH também passou a diferir da testemunha sendo superior a esta, e as demais dinamizações se mantiveram também estatisticamente superiores à testemunha.

Se assemelhando a esse resultado, só que em outro patossistema, Rossi et al., (2007) observaram redução na severidade de *Xanthomonas vesicatoria* utilizando preparado homeopático da própria bactéria (bioterápico) na cultura do tomate quando os tratamentos 6CH e 24CH, aplicados na água de irrigação, se mostraram eficientes na indução de resistência contra a doença na parte aérea das plantas, sendo inclusive a aplicação via água de irrigação mais efetiva que a aplicações dos homeopáticos na parte aérea da planta.

Na variável área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), que é um resumo quantitativo da intensidade da doença ao longo do tempo, pode-se observar que todas as dinamizações homeopáticas também foram superiores estatisticamente à testemunha.

Tabela 2 - Comprimento das lesões (cm) no 4º, 8º e 12º dia após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de soja tratadas com prata coloidal, em doses homeopáticas e ponderais e inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamento	Comprimento lesão (cm)			AACPD ⁽²⁾
	4º DAI ⁽¹⁾	8º DAI	12º DAI	
TÑF ⁽³⁾	5,51 a ⁽⁸⁾	10,91 a	14,45 a	92,73 a
TF ⁽⁴⁾	5,19 a	9,41 b	12,73 b	82,49 b
0,58 mg L ⁻¹⁽⁵⁾	4,58 b	9,26 b	12,03 b	78,56 b
1,75 mg L ⁻¹⁽⁵⁾	4,97 b	9,27 b	12,58 b	81,42 b
2,92 mg L ⁻¹⁽⁵⁾	5,38 a	9,87 b	13,10 b	84,78 b
CV(%)	6,9	5,51	4,05	4,56
SH ⁽⁶⁾	5,71 a	11,09 a	14,95 a	95,53 a
6CH ⁽⁷⁾	3,59 b	8,70 b	13,30 b	75,29 b
12CH	4,37 b	8,98 b	13,60 b	78,47 b
18CH	4,03 b	8,83 b	13,28 b	77,44 b
24CH	3,95 b	9,07 b	13,33 b	78,37 b
30CH	4,78 a	9,46 b	13,23 b	82,34 b
CV(%)	15,51	7,51	5,59	7,68

(1) DAI: dias após inoculação.

(2) AACPD = $\sum [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$.

(3) TÑF: testemunha não ferida.

(4) TF: testemunha ferida.

(5) Concentrações de prata coloidal.

(6) SH: solução hidroalcoólica (mesmo teor álcool das homeopatias).

(7) CH: centesimal hahnemanniana (escala na qual foram feitas as homeopatias).

(8) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott knott ($P \leq 0,05$).

O menor avanço da doença observado nas plantas tratadas previamente com preparados homeopáticos em relação à testemunha pode significar que as homeopantias podem funcionar como elicitores. Shah-rossi et al. (2009) também obtiveram atraso no avanço da doença pelo uso, anterior a inoculação, de homeopáticos. O experimento foi realizado utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com *Pseudomonas syringae*. O tratamento que reduziu a doença foi produto comercial composto por uma mistura de diferentes nutrientes dinamizados (N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Co, Mn, B, Zn, V, Mo, Si, Ge e ácido urónico) reduzindo a infecção em média 12,5%.

Rissato et al. (2016) também observou efeito de medicamentos homeopáticos na evolução de *S. sclerotiorum* em plantas de feijão. Os tratamentos foram administrados no solo três dias antes da inoculação, no dia da inoculação e 3, 10 e 17 dias após a inoculação, no estudo todas as dinamizações testadas de *Phosphorus* (6 CH, 12 CH, 24 CH, 36 CH e 48 CH) e a dinamização 6CH de *Calcarea carbonica* reduziram o progresso da doença.

Apesar de nenhum medicamento ter suprimido completamente a doença, os resultados apresentados pelos tratamentos homeopáticos se mostram significativos uma vez que a cada 10% de dano no estágio R7, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja, ocorrem perdas de 133 a 333 kg ha⁻¹ (JACCOUD FILHO et al., 2017). Assim, a homeopatia de prata coloidal se mostra como uma possível ferramenta no manejo da doença.

Estes resultados reforçam a premissa de Hahnemann (1984) de que a ação do medicamento homeopático se dá no doente e não na doença. Segundo ele o medicamento afeta a força vital do indivíduo causando alterações em seu estado de saúde, que exprime uma ação oposta para assim reestabelecer seu equilíbrio.

5 CONCLUSÕES

Nas condições nas quais o experimento foi conduzido a prata coloidal não influenciou no crescimento e desenvolvimento das plantas de soja e nem em sua nodulação.

As doses ponderais de prata coloidal apresentaram efeito fungistático em *S. sclerotiorum*, enquanto as homeopatas de prata coloidal nas dinamizações 12 e 18CH aumentaram a velocidade de crescimento do fungo.

Quanto a produção de gliceolina em cotilédones de soja foi observado que a prata coloidal é elicitora no acúmulo da fitoalexina. No que diz respeito as doses homeopáticas a dinamização 18CH incrementou a concentração de gliceolina.

No experimento *in vivo* foi possível detectar efeito da prata coloidal em dose ponderal na redução da lesão causada pelo fungo *S. Sclerotiorum* no 4º dia após a inoculação nas plantas de soja (concentrações 0,58 mg L⁻¹ e 1,75 mg L⁻¹). Todas as dinamizações homeopáticas de prata coloidal apresentaram efeito de diminuição da evolução da lesão.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005.

ANDRADE, F. M. C. DE A.; CASALI, V. D. C. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v. 6, n. 1, p. 49–56, 2011.

ANTONIO PATTO RAMALHO, M. et al. Impact of biosynthesized silver nanoparticles on protein and carbohydrate contents in seeds of *Pisum sativum* L. Ansar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 16, p. 261–264, 2016.

ASHRAFI, M. et al. Effect of nanosilver application on agronomic traits of soybean in relation to different fertilizers and weed density in field conditions. **Environmental and Experimental Biology**, v. 11, p. 53–58, 2013.

BARROS, D. C. M. et al. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mold of soybean using saprobic fungi from semi-arid areas of northeastern Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 22, p. 251–255, 2015.

BOGLE, K. A.; DHOLE, S. D.; BHORASKAR, V. N. Silver nanoparticles: synthesis and size control by electron irradiation. **Nanotechnology**, v. 17, n. 13, p. 3204–3208, 14 jul. 2006.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

BONATO, C. M. **Mecanismo de Atuação da Homeopatia em Plantas**. In: Seminário Brasileiro de Homeopatia na Agropecuária Orgânica, Toledo, 2004. Anais. p 17-44, 2004.

BONATO, C. M.; PROENÇA, G. T. DE; REIS, B. Homeopathic drugs *Arsenicum album* and *Sulphur* affect the growth and essential oil content in mint (and essential oil content in mint (*Mentha arvensis* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, 19 mar. 2009.

BÖNNEMANN, H.; RICHARDS, R. M. Nanoscopic Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2001, n. 10, p. 2455–2480, 1 set. 2001.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1. ed. Wiley, 1990.

DELGADO, G. V. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. **Boletim de Pesquisa**, 2007.

FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. Doenças da soja no Brasil. Circular Técnica n. 1, Londrina, PR: Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 1979.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of Soybean Development**. Ames: [s.n.]. v. 80, 1977.

GAMA, E. V. S. et al. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 649–656, 2015.

GARNER, K. L.; KELLER, A. A. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 8, p. 2503, 3 ago. 2014.

GOZZO, F.; FAORO, F. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): Moving from the lab to the field. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12473–12491, 2013.

GURR, S. J.; RUSHTON, P. J. Engineering plants with increased disease resistance: What are we going to express? **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 275–282, 2005.

HAHNEMANN, S. **Organon da Arte de Curar**. 6 ed. São Paulo. Benoit Mure, p. 159, 1984.

HILL, J. W. **Colloidal Silver: medical uses, toxicology e manufacture**. 3. ed. Indiana: Clear Springs Press, 2009.

HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.

JACCOUD FILHO, D. S. . et al. Mofo-Branco: introdução, histórico, situação atual e perspectivas. In: JACCOUD FILHO, D. S. et al. (Eds.). . **Mofo Branco**. 1. ed. Ponta Grossa: Toda Palavra, 2017. p. 29–73.

- KANHED, P. et al. *In vitro* antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. **Materials Letters**, v. 115, p. 13–17, 15 jan. 2014.
- KHAYDAROV, R. A. et al. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 5, p. 1193–1200, 2009.
- KOCH, S. et al. A crop loss-related forecasting model for sclerotinia stem rot in winter oilseed rape. **Phytopathology**, v. 97, n. 9, p. 1186–1194, set. 2007.
- KULL, L. S. et al. Evaluation of resistance screening methods for sclerotinia Stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1471–1476, 2003.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. C, p. 350–382, 1987.
- LOCKIE, A.; GEDDES, N. **Guia Completo de Homeopatia Princípios e Métodos de Tratamento**. 1. ed. São Paulo: Ática, 2001.
- LONG, D.; WU, G.; CHEN, S. Preparation of oligochitosan stabilized silver nanoparticles by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 7, p. 1126–1131, 1 jul. 2007.
- LORENZETTI, E.; STANGARLIM, J. R. Induction of phytoalexin gliceolin in soybean by homeopathic medicines. **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 11, p. 41271–41274, 2016.
- MAHDIZADEH, V.; SAFAIE, N.; KHELGHATIBANA, F. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. **Journal of Crop Protection**, v. 4, n. 3, p. 291–300, 2015.
- MALLICK, K.; WITCOMB, M. J.; SCURRELL, M. S. Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route. **Journal of Materials Science**, v. 39, n. 14, p. 4459–4463, jul. 2004.
- MARCIA, V. T. et al. Fungitoxicity activity of homeopathic medicines on *Alternaria solani*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3824–3838, 2016.
- MENDES, J. E. et al. Atifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopatogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds. **World Academy of Science**, v. 8,

n. 9, p. 933, 2014.

MEYER, M. C. et al. Ensaios cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. **Documentos - EMBRAPA**, n. 345, p. 101, 2014.

MIORANZA, T. M. et al. Control of *Meloidogyne incognita* in tomato plants with highly diluted solutions of *Thuya occidentalis* and their effects on plant growth and defense metabolism. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2187–2200, 4 ago. 2017.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 1 out. 2005.

OLIVEIRA, B. S. J. et al. Activation of biochemical defense mechanisms in bean plants for homeopathic preparations. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 11, p. 971–981, 2014.

OLIVEIRA, J. S. B. et al. Indução de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro por preparadoshomeopáticos de *Eucalyptus citriodora*. **VII Congresso Brasileiro de Agroecologia**, 2011.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 152–158, mar. 2016.

PAULO, A. L. D. **O que você precisa saber sobre o Medicamento Homeopático**. 2. ed. São Paulo: Organon, 2001.

PIAS, O. H. DE C. et al. Variáveis biométricas e componentes produtivos da cultura do trigo: mapeamento e correlação entre variáveis. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 15, n. 3, p. 227–236, 18 nov. 2016.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 347–375, 4 ago. 2014.

PULIT, J. et al. Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 795–798, 2013.

REIS, A.; NASCIMENTO, W. New apiaceous hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* in the

Cerrado region of Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 122–124, mar. 2011.

REYMOND, P. et al. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in arabis. **The Plant Cell**, v. 12, p. 707–719, 2000.

RISSATO, B. B. et al. Control of white mold in bean plants by homeopathic medicines. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 24, p. 2174–2178, 2016.

ROSSI, F. et al. Aplicação de bioterápico visando induzir resistência em tomateiro contra mancha bacteriana. **Congresso Brasileiro de Agroecologia**, n. 4, p. 858–861, 2007.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. **Sclerotinia diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008.

SALAMA, H. M. H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). **International Research Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 10, p. 190–197, 2012.

SCHLICH, K.; HUND-RINKE, K. Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 321–330, 1 jan. 2015.

SEGALA, K. et al. Silver nanoparticles incorporated into nanostructured biopolymer membranes produced by electrospinning: a study of antimicrobial activity. **Article Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, 2015.

SHAH-ROSSI, D.; HEUSSER, P.; BAUMGARTNER, S. Homeopathic treatment of *arabidopsis thaliana* plants infected with *Pseudomonas syringae*. **The Scientific World JOURNAL**, v. 9, p. 320–330, 20 maio 2009.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, 1 jul. 2004.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. [s.l.] Artmed, 2017.

THEOPHEL, K. et al. The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p.

544, 2014.

THURMAN, R. B.; GERBA, C. P. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 18, n. 4, p. 295–315, jan. 1989.

TOLEDO, M. V.; STANGARLIN, J. R.; BONATO, C. M. Controle da pinta preta em tomateiro com preparados homeopáticos de própolis. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 471–474, 2009.

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, v. 44, n. 6, p. 1920–1934, 2004.

VILLAMIZAR-GALLARDO, R.; CRUZ, J. F. O.; ORTÍZ, O. O. Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 12, p. 1929–1936, 2016.

WOO KIM, S. et al. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 53–58, 2012.

ZHAI, Y. et al. Silver nanoparticles, ions, and shape governing soil microbial functional diversity: nano shapes micro. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1123, 2016.

ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceollin accumulation in soybeans by an extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 3, p. 321–331, 1982.