



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de
acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de
*Meloidogyne incognita***

PAULA DARLINY SILVA FERREIRA

**BRASÍLIA
2019**



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de
acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de
*Meloidogyne incognita***

PAULA DARLINY SILVA FERREIRA

**BRASÍLIA
2019**

PAULA DARLINY SILVA FERREIRA

**Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de
acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de
*Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia
do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de
Brasília, como requisito parcial a obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Juvenil Enrique Cares

Coorientador: Dr. Thales Lima Rocha

BRASÍLIA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Paula Darliny Silva.

Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de *Meloidogyne incognita*

Brasília, 2019. Número de páginas p.: 123 il.

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

I. Metabólitos secundários – *Meloidogyne incognita*

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT

II. Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de *Meloidogyne incognita*

Deus et.al

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu criador, escritor da minha história, luz que me ilumina, minha única direção nessa estrada desconhecida que é a vida. Deus, por mais que eu não possa vê-lo, pude senti-lo em todos os meus dias, em especial naqueles mais difíceis quando por um momento olhei pra trás e me dei conta de toda a minha trajetória. O senhor foi generoso comigo, mesmo quando passei por momentos sombrios eu pude ver uma luz, e me guiou quando estive perdida. Não chegaria até aqui sem tua ajuda, não poderia ser quem eu sou, e não haveria uma continuação a partir daqui. Por tudo, sou infinitamente grata! O senhor foi o único que consolou minha alma quando sozinha chorei, e me acalmou os ânimos quando em desistir eu pensei, e me fez entender o grande sonho que carrego dentro de mim. Para o senhor eu guardo a definição mais bonita; “És a própria natureza em toda sua perfeição, grandeza e simplicidade, porém rica em impecáveis detalhes”, o senhor é o meu amanhã e o meu para sempre.

À minha mãe que não pode me ver chegar até aqui, mas compartilhou meus sonhos comigo por toda sua vida. Todo o seu esforço, e perfeita dedicação me permitiu chegar até aqui, e me dará base para seguir adiante. Não tê-la aqui comigo é a maior tristeza da minha vida, por que você quem era a minha maior alegria. Espero que saiba que você foi o meu grande exemplo na vida, que em sua memória irei superar todo e qualquer desafio que me for proposto. Durante toda a minha vida, tive plena consciência que me esforcei para orgulhá-la, e continuarei a me dedicar pelo orgulho que sinto da incrível mulher que foi. Ela sempre dizia que Deus a havia abençoado quando me concedeu a ela, quando na verdade a abençoada fui eu de ter um anjo em minha vida, que agora num verdadeiro anjo se materializou. Eu te amarei para sempre, assim como você sempre me amou, de uma maneira pura e até o fim.

Ao meu pai e irmão; Pedro Ferreira e Paulo Ferreira, que passaram por seus piores momentos e não desistiram, assim como eu. Mesmo com todas as nossas diferenças, continuamos sendo uma família e a família sempre será a maior base que alguém poderá ter. Obrigado por serem à minha família, eu amo vocês e sou grata por me apoiarem até aqui, e a partir daqui.

Aos meus professores da época da graduação; Ciro Yoshio Joko, Rafael Perseghini Del Sarto e Aline Martins por terem sido meus primeiros incentivadores, que plantaram dentro de mim a semente da paixão em disseminar ciência. Se hoje estou aqui, é por “culpa” de vocês!

Aos melhores orientadores que alguém pode ter: Dr: Thales Lima Rocha e Professor Juvenil Enrique Cares. Eu sou tão agradecida por tê-los como tutores, e quero que saibam que na

minha perspectiva os senhores são grandes mestres, não apenas na ciência, mas da vida. Com os senhores eu aprendi os valores do esforço, dedicação e trabalho, e principalmente da humildade, prestatividade, e amor pelo que se faz. São duas almas brilhantes, e me orgulho de ter sido “*alumnus*” dos senhores, que me iluminaram com tamanha luz de seus conhecimentos. Sou grata por ter um relacionamento tão positivo com os meus orientadores, que considero como sendo os meus pais da ciência.

As minhas queridas amigas Adriana Ferreira e Sheila Freitas, que apareceram na minha vida num momento muito difícil para mim, e que foram exatamente o reforço e apoio que eu tanto precisava. Tenho muito orgulho de quem vocês são, e as pessoas não sabem a sorte que teriam se dessem a oportunidade de as conhecerem como eu conheço. Foram muitas noites de estudo, muitas guerras que juntas enfrentamos, muitos momentos que compartilhamos, e incondicionalmente nos apoiamos. Nesse capítulo da minha vida posso afirmar, vocês foram umas das pessoas que mais me ajudaram a escrever! Meu muitíssimo obrigado.

A Rejane Valeriano da Silva, aluna do curso de Engenharia agrônômica da Universidade de Brasília – UnB, que me ajudou nas avaliações e contagens do experimento de resistência. Foram dias intensos de trabalho maçante e cansativo, mas ela esteve comigo até o final, me ajudando com o seu melhor. Sou extremamente grata por tamanha contribuição, e é uma pessoa pelo qual tenho enorme carinho e fé no seu grande potencial.

Aos meus professores; Juvenil Cares, Cleber Furlaneto, Jansen Santos, Marisa Ferreira, Cláudio Costa, Dianese, Adalberto Café, Alice Nagata, Luiz Blum, Bruno, Suelí Mello, Rita e Renato Resende por todos os ensinamentos e conselhos prestados. O excelente corpo docente abrilhanta ainda mais o programa em Fitopatologia da UnB.

Aos meus amigos do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília; pelos momentos de descontração, por segurarem a barra comigo, e por compartilharmos tantas memórias. O tempo que passamos juntos foi muito especial.

Aos meus amigos da vida; Fabrício Cavalcante, Vívian Nogueira, Aline Dias, Akemi Saiki, Thâmora Moana, Lucas de Sá e Cássio Mateus. Obrigado por serem os melhores amigos que alguém pode ter. Vocês são os presentes que a vida me deu!

Aos meus colaboradores; Suelí Marques Côrrea Melo e toda a equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, pela disponibilidade da estrutura física e toda a contribuição na realização dos experimentos com *Trichoderma*.

Ao Jonny Everson Sherwinski Pereira e toda a equipe do Laboratório de Tecidos Vegetais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, em especial ao André Xavier e Inaê Mariê por toda ajuda e paciência comigo na realização do teste de germinação com Soja *in vitro*.

A toda equipe do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, em especial ao José Cardozo e ao Daniel Sifuentes por serem sempre tão prestativos, por compartilharem comigo seus conhecimentos sobre métodos cromatográficos e bioquímica em geral, e por sempre me fazerem sentir confortável e me integrarem ao grupo. Tenho por ambos profunda admiração.

A toda a equipe do Laboratório de Genômica e Proteômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, por me permitirem usufruir de sua estrutura nas mais diversas situações em que precisei, em especial ao Lucas José por ser um excelente fotógrafo e amigo, e ao Ivonaldo por me ajudar nos ensaios com bactéria e levedura .

A Dra. Ieda Carvalho Mendes do Laboratório de Microbiologia do Solo e Micorrizas da Embrapa Cerrados, por ceder da sua coleção de bactérias para a realização de experimentos valiosos na confecção desse trabalho.

A Dra. Graziella Anselmo Joanitti do Laboratório de Nanotecnologia da Universidade de Brasília – UnB, por me proporcionar a realização dos experimentos utilizando fibroblastos e queratinócitos, e a Alícia Ombredane por me ajudar tanto na realização desses experimentos, quanto nas análises estatísticas gerais do meu trabalho. “Lili” você foi minha cereja do bolo, essencial para que esse trabalho se tornasse possível, e é uma preciosa amiga por quem tenho profunda admiração e gratidão. Meu muitíssimo obrigado!

A Dra. Vera Lúcia P. Polez e aos companheiros do Laboratório de Prospecção em Compostos Bioativos (LPCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, em especial Carla Becker Soll, por me auxiliarem na realização de tantos experimentos, obtenção e interpretação de resultados, pelo companheirismo e as boas horas de conversas e risadas.

Aos companheiros do Laboratório de Nematologia da Universidade de Brasília – UnB, por todos os momentos, noites em claro, e companheirismo.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de ingressar no curso, realizar o meu mestrado com ótimas referências e um excelente corpo docente.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização da estrutura, recursos e os equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

À todos vocês, todo o meu carinho e gratidão!

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”.

(Edgar Allan Poe)

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Juvenil Enrique Cares e coorientação do Dr. Thales Lima Rocha, com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de *Meloidogyne incognita*

PAULA DARLINY SILVA FERREIRA

DISSERTAÇÃO APROVADA em 19/12/2019 por:

Dr. Jadir Borges Pinheiro

Examinador Externo - Embrapa Hortaliças

Dr. Tiago Gonçalves da Costa

Examinador Externo – Educacional LS

Prof. Adalberto Correa Café Filho

Suplente – Universidade de Brasília

Prof. Juvenil Enrique Cares

Orientador (Presidente da Banca) – Universidade de Brasília

BRASÍLIA, DF

2019

Sumário

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS..... | IV |
| LISTA DE FIGURAS..... | V |
| LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIÇÕES E UNIDADES..... | X |
| RESUMO GERAL | XII |
| ABSTRACT | XIV |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 2.1 Objetivos gerais | 7 |
| 2.2 Objetivos específicos | 7 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 8 |
| 3.1 A introdução dos defensivos agrícolas como potencializadores de produção..... | 8 |
| 3.2 Produtos de proteção fitossanitária..... | 8 |
| 3.3 Nematoides fitopatogênicos..... | 11 |
| 3.4 Nematoides das galhas: Gênero <i>Meloidogyne</i> | 13 |
| 3.5 Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp..... | 15 |
| 3.6 Métodos alternativos de controle de fitonematoides..... | 18 |
| 3.7 Plantas como fontes para a obtenção de biomoléculas | 21 |
| 3.8 Extratos vegetais..... | 23 |
| 3.9 Metabolismo vegetal | 23 |
| 3.10 Família Solanaceae | 25 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 Multiplicação de <i>Meloidogyne incognita</i> em planta de Tabaco | 27 |
| 4.2 <i>Meloidogyne</i> spp.: Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> , <i>M. enterolobii</i> e <i>M. javanica</i> a partir de plantas de tabaco e tomate infectadas | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.3 Manutenção dos acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae em casa de vegetação para preparo do extrato proveniente de raízes | 29 |
| 4.4 Obtenção dos extratos cru aquosos (ECA's) de raízes dos acessos de uma espécie de Solanácea | 29 |
| 4.5 Obtenção dos extratos crus aquosos (ECA's) de sementes dos acessos de solanáceas | 30 |
| 4.6 Liofilização dos extratos | 30 |
| 4.7 Ensaios biológicos: | 30 |
| 4.7.1 Bioensaio <i>in vitro</i> de viabilidade de juvenis de <i>Meloidogyne spp</i> , para certificação da atividade nematostática dos ECAs dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae..... | 30 |
| 4.7.2 Bioensaio <i>in vitro</i> de recuperação de juvenis de <i>Meloidogyne spp</i> , para certificar atividade nematotóxica: (nematostática e/ou nematicida)..... | 31 |
| 4.7.3 Curva de concentração para avaliação da menor concentração nematotóxica e DL ₅₀ dos ECAs sobre juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> | 31 |
| 4.7.4 Testes de termoestabilidade: | 32 |
| 4.7.5 Avaliação da reação dos acessos de Solanaceae utilizados para obtenção dos ECA's | 32 |
| 4.7.6 Avaliação de toxicidade dos ECA's ativos sobre hemácias | 33 |
| 4.7.7 Avaliação de toxicidade dos ECA's ativos em juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> sobre células do ovário de <i>Spodoptera frugiperda</i> | 33 |
| 4.7.8 Avaliação de toxicidade dos ECA's oriundos de sementes em Queratinócitos humanos (HaCat) | 34 |
| 4.7.9 Tripsinização dos Queratinócitos humanos (HaCat) | 34 |
| 4.7.10 Plaqueamento das células de Queratinócitos humanos (HaCat) | 35 |
| 4.7.11 Tratamentos dos Queratinócitos humanos com os ECAs das sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) | 35 |
| 4.7.12 Teste de viabilidade celular de Queratinócitos humanos (HaCat) – Ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2- il)-2,5-difenil-tetrazol) | 35 |
| 4.7.13 Avaliação da fitotoxicidade dos ECAs de sementes de acessos de uma espécie de solnácea em semente de soja | 36 |
| 4.8 Bioensaio de especificidade dos ECAs contra organismos não-alvo..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 4.8.1 Avaliação da ação dos ECA's ativos utilizando estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079) | 37 |
| 4.8.2 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre <i>Trichoderma</i> (<i>T. asperellum</i> - CEN 162 e <i>T. harzianum</i> - CEN 267) | 37 |
| 4.8.3 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre <i>Candida maltosa</i> (CA 49) | 38 |
| 4.9 Métodos Cromatográficos; | 38 |
| 4.9.1 Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) - Coluna de exclusão molecular. | 38 |
| 4.9.2 Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Performance de Adsorção por Fase Reversa (RP-HPLC)..... | 39 |
| 4.10 Identificação das massas de ionização e dessorção a laser assistida por uma matriz e análise por tempo de voo (MALDI/TOF) dos componentes das frações de S48 e Fr6. | 39 |
| 5. RESULTADOS | 40 |
| 5.1 Bioensaio <i>in vitro</i> de viabilidade e recuperação de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos das raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae..... | 40 |
| 5.2 Bioensaio <i>in vitro</i> de viabilidade e recuperação de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae..... | 41 |
| 5.3 Bioensaio <i>in vitro</i> de viabilidade e recuperação de juvenis de <i>Meloidogyne javanica</i> para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos de raízes e sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae. | 43 |
| 5.4 Bioensaio <i>in vitro</i> de viabilidade e recuperação de juvenis de <i>Meloidogyne enterolobii</i> para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos de sementes dos acessos (48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae..... | 45 |
| 5.5 Curva de concentração para avaliação da menor concentração nematotóxica e DL ₅₀ dos ECAs sobre juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> | 47 |

| | |
|--|----|
| 5.6. Avaliação da termoestabilidade dos ECA's ativos provenientes de sementes sobre <i>Meloidogyne incognita</i> | 49 |
| 5.7. Avaliação da reação dos acessos de Solanaceae utilizados para obtenção dos ECA's | 51 |
| 5.8. Avaliação de toxicidade dos ECAs ativos sobre hemácias | 53 |
| 5.9. Avaliação de toxicidade dos ECA's ativos em juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> sobre células do ovário de <i>Spodoptera frugiperda</i> | 53 |
| 5.10 Avaliação de toxicidade dos ECA's oriundos de sementes em Queratinócitos humanos (HaCat) | 54 |
| 5.11. Avaliação da fitotoxicidade dos ECA's oriundos de sementes sobre a germinação de soja (<i>Glycine max</i>) | 55 |
| 5.12. Bioensaio de especificidade dos ECAs contra organismos não-alvo..... | 58 |
| 5.12.1 Avaliação da ação dos ECA's ativos utilizando estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (SEMIA 5079) | 58 |
| 5.12.2 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre <i>Trichoderma</i> (<i>T. asperellum</i> - CEN 162 e <i>T. harzianum</i> - CEN 267) | 58 |
| 5.12.3 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre <i>Candida maltosa</i> (CA 49)..... | 59 |
| 5.13. Ação das frações resultantes da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) - Coluna de exclusão molecular, sobre J2 de <i>M. incognita</i> | 60 |
| 5.14. Purificação da fração ativa resultante do HPLC por exclusão molecular via Cromatografia Líquida de Alta Performance de adsorção por fase reversa (HPLC-RP), e identificação das massas moleculares presentes nas frações. | 63 |
| | 66 |
| 6. DISCUSSÃO | 67 |
| 7. CONCLUSÕES | 75 |
| 8. PERSPECTIVAS | 76 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificação dos agroquímicos de acordo com os efeitos à saúde humana.....10
- Tabela 2.** Dose inibitória letal média (DL₅₀) dos ECAs de sementes dos acessos (48, 52 e 78) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.....49
- Tabela 3.** Reação dos acessos de uma espécie de Solanaceae ao nematoide *Meloidogyne incognita*.....52
- Tabela 4.** Avaliação de fitotoxicidade das variáveis das plântulas de soja tratadas com 1 mg dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae em meio MS, com 15 dias pós-semeadura.....56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos envolvidos no parasitismo de *Meloidogyne* sp. que resultaram em dano para a hospedeira. Fonte: adaptado de Asmus (2001).....14
- Figura 2.** Etapas do ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* - **1.** Penetração na raiz; **2.** Migração até a zona meristemática para atingir o cilindro vascular; **3 e 4.** Estabelecimento do sítio de alimentação; **5.** transformação das células parenquimáticas e células gigantes; **6.** Desenvolvimento das células gigantes; **7.** Processos hiperplásticos do meta-floema; **8.** Oviposição; **9.** Eclosão dos juvenis. Fonte: Costa (2018).....17
- Figura 3.** Raiz de *Nicotiana tabacum* infectada por *Meloidogyne incognita*. Fonte: Paula Ferreira, 2019.....27
- Figura 4.** Raízes dos acessos provenientes de uma espécie de Solanaceae, utilizadas para a obtenção dos ECAs. (A) Acesso 11; (B) Acesso 48; (C) Acesso 52; (D) Acesso 78. Fonte: Paula Ferreira, 2019.....29
- Figura 5.** Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. Controle negativo (C-) dH₂O; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....40
- Figura 6.** Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do ensaio de viabilidade *in vitro*. Bioensaio realizado em triplicata, na concentração de 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa

estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$41

Figura 7. Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$42

Figura 8. Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do ensaio de viabilidade *in vitro*. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$43

Figura 9. Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes e raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$44

Figura 10. Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de raízes e sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como

controle negativo (C-) dH₂O; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....45

Figura 11. Bioensaio de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre J2 de *Meloidogyne enterolobii*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....46

Figura 12. Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne enterolobii*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. Bioensaio realizado em triplicata, na concentração de 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....47

Figura 13. Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae em diferentes concentrações (100, 250, 500 e 1000 mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....48

Figura 14. Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, em diferentes concentrações (100, 250, 500 e 1000 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. Bioensaio realizado em triplicata,

tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....49

Figura 15. Bioensaio de viabilidade dos ECAs ativos provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, tratados termicamente por 24 horas a 50 °C, após 48 horas de exposição sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....50

Figura 16. Bioensaio de recuperação dos nematoides tratados com os ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78), para atestar a estabilidade térmica da ação nematicida sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. Bioensaio realizado em triplicata, na concentração de 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.....51

Figura 17. Sintoma e sinais da infecção de *Meloidogyne incognita* em raiz de tabacco (utilizada como controle negativo (C-) no ensaio para aferir a reação ao nematoide (resistente ou suscetível) dos acessos utilizados para a obtenção dos ECAs. Na imagem é possível visualizar as massas de ovos coradas em vermelho (por floxina B), e a presença de galhas radiculares como reação da planta a infecção (Fotos: Paula Ferreira).....52

Figura 18. Avaliação de citotoxicidade dos ECAs ativos de sementes dos acessos de uma espécie pertencente à família Solanaceae, sobre hemácias bovinas em diferentes concentrações (1,5 mg, 1,0 mg, 500 µg, 250 µg e 100 µg). Os ECAs ativos foram ressuspensos em solução fisiológica (NaCl), que também foi utilizada como controle negativo (C-), sendo dH₂O, o controle positivo (C+).....53

Figura 19. Avaliação de citotoxicidade *in vitro* dos ECAs ativos de sementes, provenientes de acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre células do ovário de *Spodoptera frugiperda*. Para esse ensaio, foram utilizados dH₂O para curva de calibração, meio contendo as células sem tratamento (C-) e DMSO (C+). A viabilidade celular foi mensurada considerando-se a absorbância detectada por espectrofotômetro para cada tratamento, e a concentração dos ECAs para esse ensaio foi a mesma utilizada para o controle dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, sendo aplicada 1 mg. ml⁻¹54

Figura 20. Citotoxicidade dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre Queratinócitos humanos (HaCat). O ensaio foi realizado em diferentes concentrações dos ECAS (125, 250, 500, e 1000 µg/ml⁻¹), sendo o período de exposição dos queratinócitos aos ECAs de 48 horas, sendo H₂O utilizada para a curva de calibração. Diferença significativa quando comparados os grupos entre si pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste Tukey p<0,05.....55

Figura 21. Efeitos dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae na germinação de soja (*Glycines max*), onde avaliou-se o crescimento do colo ao ápice das plântulas de soja, 15 dias após o cultivo das sementes em meio MS, tratadas com 1mg/ml⁻¹ dos ECAs, na mesma concentração utilizada nos bioensaios *in vitro* sobre *Meloidogyne incognita*.....56

Figura 22. Média dos pesos fresco e seco das raízes, e pesos fresco e seco total das plântulas de soja (*Glycine max*), 15 dias após o cultivo das sementes em meio MS, tratadas com 1mg/ml⁻¹ dos ECAs das sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae.....57

Figura 23. Plântulas de soja germinadas em meio MS, tratadas com 1mg/ml⁻¹ dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae. Da esquerda para a direita; plântulas tratadas com H₂O (C-), e ECAs S11, S48, S52 e S78. A imagem demonstra o bom desenvolvimento radicular das plântulas tratadas com os ECAs, não havendo indícios da ação fitotóxica desses extratos para a germinação das sementes, onde o desenvolvimento das plântulas foi considerado normal, e até superior ao controle. As plântulas

foram avaliadas 15 dias após serem cultivadas em meio MS, e mantidas por esse período em sala de cultura de tecidos (Fotos: Paula Ferreira).....57

Figura 24. Bioensaio *in vitro* utilizando os ECAs (1mg/ml^{-1}) provenientes de sementes dos acessos ativos para *Meloidogyne incognita* (S48, S52 e S78) de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA-5079), cultivada em meio TY por 48 horas. O controle negativo para esse bioensaio foi H₂O (estéril). Os ECAs e o controle foram dispensados sobre discos de papel filtro no meio de cultivo bacteriano, sendo mantidos por 48 horas na temperatura de 28° C (Fotos: Paula Ferreira).....58

Figura 25. Crescimento micelial de *Trichoderma asperellum* (162) e *T. harzianum* (287) em meio batata dextrose ágar (BDA) com 10 mg dos ECAs de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de plantas da família Solanaceae (Fotos: Paula Ferreira).....59

Figura 26. Bioensaio *in vitro* utilizando os ECAs ativos das sementes dos acessos (S48, S52 e S78) de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre o crescimento de *Candida maltosa* (CA 49). Os ECAs foram dispensados na mesma concentração utilizada nos bioensaios *in vitro* com *Meloidogyne incognita* (1mg.ml^{-1}), sobre discos de papel filtro, fixados no meio YPD, onde a levedura foi cultivada. Sobre os discos está a identificação de cada ECA utilizado, sendo H₂O (estéril) utilizada como controle negativo. (Fotos: Paula Ferreira).....60

Figura 27. Cromatograma via HPLC-ME, do ECA da semente do acesso S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae, com 11 frações coletadas nos diferentes tempos de retenção, monitoradas pelos espectros; 216, 254 e 280 nm. A purificação foi realizada, utilizando-se coluna GE Healthcare SuperdexTM 200 (10/300 GL).....61

Figura 28. Bioensaio *in vitro* de viabilidade sobre os nematoides tratados com as Frações (Fr) provenientes do ECA ativo de sementes do acesso 48 de uma espécie de planta da família Solanaceae (resultantes de cromatografia via HPLC-ME), após 48 horas de exposição sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de 250 µg em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e

controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$62

Figura 29. Bioensaio *in vitro* de recuperação dos nematoides tratados com as Frações (Fr) provenientes do ECA ativo de semente do acesso 48 (resultantes de cromatografia via HPLC-ME), após 24 horas da recuperação dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* tratados com as frações na concentração de 250 µg em 500 µl/VF . O bioensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo*: $p < 0,0001$63

Figura 30. Cromatograma da fração 6 com atividade nematocida concentrada (proveniente do ECA ativo de semente S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae) via HPLC - RP, com 17 frações coletadas nos diferentes tempos de retenção, monitorados pelos espectros; 216, 254 e 280 nm. A coluna empregada foi a (RP), Jupiter 5µ, C18, 300A, C18 (10 mm x 250 mm) O 20.....64

Figura 31. Espectro de massas via MALDI-TOF da fração 6 – Fr6 (proveniente do ECA ativo de semente S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae) que apresentou atividade nematocida concentrada dentre todas as frações resultantes da purificação via HPLC-ME.....64

Figura 32 - Espectros de massas via MALDI-TOF das frações (4, 8, 9, 10, 11 e 12) obtidas a partir da fração com a atividade nematocida concentrada (Fr6), via HPLC-RP.....65

Figura 33 - Espectros de massas via MALDI-TOF das frações majoritárias; (15, 16, e 17) da fração com a atividade nematocida concentrada (fração 6, oriunda do ECA ativo de semente S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae), via HPLC-RP.....66

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

| | |
|--|---|
| MS- Murashige & Skoog (meio de cultura) | B.O.D.- Demanda Biológica de Oxigênio (estufa incubadora) |
| BDA- bata dextrose ágar (meio de cultura) | MTT- [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] |
| YPD- Yeast extract Peptone Dextrose (meio de cultura) | DMSO- dimetilsulfóxido |
| mg- miligrama | NADPH- fosfato de nucleotídeo de nicotinamida e adenina |
| mg/l- miligrama por litro | NADH- dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| mg/ml- miligrama por mililitro | ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunológico com enzima conjugada) |
| ml- mililitro | NCCLS- Comitê Nacional para Laboratório de Análises Clínicas |
| µg- micrograma | IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| µl- microlitro | ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| g- grama | MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento |
| vv- volume por volume | EPA- Agência de Proteção Ambiental |
| VF- volume final | ONU- Organização das Nações Unidas |
| °C- graus Celsius | EUA- Estados Unidos da América |
| m- milímetro | BNDS- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social |
| cm³- centímetros cúbicos | CNA- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil |
| CO₂- gás carbônico | CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento |
| %- porcentagem | |
| n^o- número | |
| <- menor que | |
| >- maior que | |
| C⁺- controle positivo | |
| C⁻- controle negativo | |
| OD- densidade ótica | |
| pH- potencial hidrogeniônico | |
| rpm- rotação por minuto | |
| dH₂O- água destilada | |
| EtOH- álcool etílico | |
| NaCl- cloreto de sódio | |
| DL50- dose letal média mínima | |
| U\$\$- dólar (moeda americana) | |

R\$- reais (moeda brasileira)

M.I.N.- manejo integrado de nematoides

ECAs- extratos crús aquosos

J1,J2,J3,J4- estadios dos juvenis de *Meloidogyne incognita*, juvenil de primeiro, segundo, terceiro e quarto estadio, respectivamente.

NG- número de galhas

NMO- número de massas de ovos

NOJ2/GR- número de ovos e J2 por grama de raiz

FR- fator de reprodução

HaCat- linhagem celular de Queratinócitos humano

HPLC- High Performance Liquid

HPLC-ME- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular

HPLC-RP- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

RESUMO GERAL

FERREIRA, Paula Darliny Silva. **Potencial nematotóxico de extratos vegetais obtidos a partir de acessos de uma espécie de Solanaceae para o controle de *Meloidogyne incognita***. 2019. 123 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Os nematoides pertencentes ao filo Nematoda, apresentam um plano corporal simples, e estão entre os grupos de animais mais abundantes da terra. Os nematoides das galhas radiculares (*Meloidogyne* spp.) são considerados um dos principais responsáveis por grandes impactos na produção agrícola mundial, afetando severamente diversas culturas de interesse econômico. Esses nematoides promovem alterações no sistema radicular das hospedeiras impedindo a absorção adequada dos nutrientes, sendo a espécie *M. incognita* a de maior destaque devido à sua alta polifagia. Algumas estratégias são adotadas como medidas de controle deste fitopatógeno, sendo o uso de nematicidas sintéticos o método mais explorado, apesar de serem nocivos ao meio ambiente e à saúde humana. Nesse cenário, surge uma demanda na busca de novos produtos nematotóxicos eficazes e ambientalmente seguros, com substâncias inovadoras que possuam ampla diversidade estrutural, como os compostos ou metabólitos de composição química diversa, oriundos de plantas. A família Solanaceae é considerada uma das maiores famílias de angiospermas com ampla distribuição mundial, sendo fonte abundante de metabólitos secundários bioativos, com relatos na literatura de diversas aplicações para o controle de fitopatógenos na agricultura. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram avaliar a reação de quatro acessos de plantas de uma espécie da família Solanaceae ao nematoide *M. incognita*; avaliar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) de extratos cru aquosos (ECAs) de sementes e raízes desses acessos sobre a fase infectante (J2) de *Meloidogyne* spp; identificar o ECA e a fração cromatográfica mais efetiva para o controle de *M. incognita*. Adicionalmente buscou-se também aferir a termoestabilidade dos ECAs com atividade nematotóxica, e a reação desses acessos à infecção por *M. incognita* por meio da quantificação da população total (ovos e J2) presentes nas raízes (NOJ2), número total de galhas (NG), número total de massas de ovos (NMO), quantidade de ovos e J2 por grama de raiz (NOJ2/GR), e o fator de reprodução (FR), inferindo-se a reação de resistência, suscetibilidade ou imunidade. Também foram aferidas a citotóxicidade sobre hemácias bovinas, células do ovário de *Spodoptera frugiperda*, e queratinócitos humanos (HaCat); fitotoxicidade sobre a germinação de soja; capacidade de inibição de organismos não-alvo, como bactéria (*Bradyrhizobium japonicum*),

fungos (*Trichoderma asperellum* e *T. harzianum*) e levedura (*Candida maltosa*) presentes no solo. Os ECAs provenientes de sementes dos acessos 48, 52 e 78 apresentaram atividade nematicida significativa na concentração de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, com mais de 90% dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. mortos, após o bioensaio *in vitro* de recuperação. Os ECAs de sementes dos acessos (48, 52 e 78) nessa concentração, também foram termoestáveis, e aferiu-se a reação de resistência para os acessos 48 e 52, sendo o acesso 78 considerado suscetível nesse estudo. Adicionalmente, os ECAs de sementes dos acessos (48, 52 e 78) apresentaram baixa citotoxicidade para hemácias bovinas e células do ovário de *S. frugiperda*. A viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) tratados com esses ECAs foi superior a 50%, e nessa concentração não foram fitotóxicos para a germinação de soja (*Glycine max*), na qual as plântulas resultantes de sementes tratadas com esses extratos, apresentaram crescimento e peso seco e fresco superiores aos do controle. Adicionalmente os ECAs de sementes desses acessos não inibiram o crescimento de fungos, bactérias e leveduras benéficos do solo. O ECA ativo de sementes do acesso 48 foi o de maior destaque dentre os tratamentos, com atividade nematicida de 100 % para a concentração de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, sendo a DL_{50} de 108.2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Esse ECA foi selecionado, e fracionado via cromatografia líquida de alta performance com coluna de exclusão molecular (HPLC-ME). Onze frações foram geradas, e avaliadas sobre *M. incognita*, sendo a fração 6 (Fr6) a mais efetiva quanto sua ação nematicida. Esta fração (Fr 6) foi selecionada para purificação via cromatografia líquida de alta performance com coluna de adsorção por fase reversa (HPLC-RP), e resultaram em outras 17 frações, onde as massas das frações obtidas a partir de HPLC-ME e HPLC RP, foram mensuradas por MALDI-TOF. Os dados gerados neste trabalho evidenciaram a potencialidade nematicida do ECA das sementes dos acessos 48, 52 e 78 de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, além de atestar a especificidade da ação para J2 de *M. incognita*, um dos fitonematoides mais importantes para a agricultura no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne javanica*, Nematicida natural, especificidade, extratos vegetais, metabólitos secundários.

Orientador – Prof. Juvenil Enrique Cares - Universidade de Brasília
Coorientador – Dr. Thales Lima Rocha- EMBRAPA CENARGEN.

GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Paula Darliny Silva. **Nematotoxic potential of plant extracts obtained from accessions of a Solanaceae species for the control of *Meloidogyne incognita***. 2019. 123 p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Nematodes belonging to the phylum Nematoda present a simple body plane and are among the most abundant animal groups on Earth. Root-knot nematodes (RKNs) (*Meloidogyne* spp.) are responsible for pronounced losses on global agricultural production, causing severe damage on a wide range of economically relevant crop species. Infection by RKNs alters the morphology of the host plant root system, preventing adequate water and nutrient absorption. *Meloidogyne incognita* is considered of high relevance due to its proeminent polyphagy. Among the several strategies to control this plant pathogen, application of synthetic chemicals with nematicidal activity is by far the most used, regardless of the environmental and human health risks. In view of this scenario, there is a pressing need to develop alternative, efficient and environmentally safe products, composed by novel substances with high structural diversity, as the ones prospected in plants containing a high abundance of diverse chemical compounds. The Solanaceae botanical family is composed by a large number of species with wide geographic distribution, representing an abundant source of bioactive secondary metabolites for the control of important plant pathogens that infect crop species. In this context, the present study aimed to evaluate the reaction of four different Solanaceae plant accessions to the nematode *M. incognita*, to certify the nematotoxic (nematostatic and/or nematicidal) activity of aqueous crude extracts (ACEs) obtained from seeds and roots of solanaceous accessions on the infecting phase (J2) of *Meloidogyne* spp. and to identify the ACE and the chromatographic fraction most effective in controlling *M. incognita*. Moreover, it also intended to evaluate thermostability of the ACEs with nematotoxic activity in previous test; and the host reaction (resistance, susceptibility, immunity) to infection by *M. incognita* of accessions from which the ACEs were originated, through quantification of total population (eggs and J2) present in the root system (NOJ2), total number of galls (NG), total number of egg masses (NMO), numbers of eggs and J2 per gram of roots (NOJ2/GR), and the reproduction factor (FR). This study also evaluated the ECAs toxicity over bovine red blood cells; ovary cells of *Spodoptera frugiperda*, and human keratinocytes (HaCat); the phytotoxicity over soybean germination; the inhibition capacity on non-target soil organisms, such as bacterium (*Bradyrhizobium japonicum*), fungi (*Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*) and yeast

(*Candida maltosa*). The seed ACEs from the accessions 48, 52 and 78 exhibited a significant nematicidal activity at the concentration of 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, causing mortality of more than 90% of J2 *Meloidogyne spp.* after the *in vitro* recovery bioassay. The seed ACEs from the accessions 48, 52 and 78 at 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ concentration, were found to be thermostable. The resistance reaction was confirmed for the accessions 48 and 52, and the accession 78 being considered susceptible in this study. Additionally, the seed ACEs from the accessions 48, 52 and 78 presented low cytotoxicity for both, bovine red blood cells and *Spodoptera frugiperda* ovary cells. The cellular viability of human keratocytes (HaCat) treated with these ACEs was superior to 50%. At this concentration, these extracts were not phytotoxic to soybean (*Glycine max*) seed germination, instead the seedlings originated from the treated seeds reacted with higher growth rate, fresh plant weight and dry plant weight, in comparison to seedlings originated from the control treatment. Also, these ACEs were not able to inhibit the growth and development of the fungi, bacterium and yeast used as model organisms, with no changes in relation to the control treatment. The bioactive seed ACE from the accession 48 presented 100% nematicidal activity at 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ concentration, and LD_{50} of 108.2 μg . Due to these results, this ACE was fractionated via Molecular Exclusion High Performance Liquid Chromatography (HPLC-ME), generating 11 fractions, that were evaluated on *M. incognita*. The fraction 6 (Fr6) demonstrated the highest nematicidal activity and was selected for further purification via Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC-RP) with the generation of another 17 fractions. The molecular mass of the fractions obtained via HPLC-ME and HPLC-RP were measured via MALDI-TOF. The data generated in this study revealed the nematicidal potential of seed ACEs from the accessions 48, 52 and 78, which belong to a plant species from the botanical Family Solanaceae. Furthermore, these data confirm the specificity of the action toward J2 of *M. incognita*, one of the most relevant plant pathogens to agricultural systems worldwide.

Keywords: *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne javanica*, Natural nematicide, Specificity, Plant extracts, Secondary metabolites.

Advisor – Prof. Juvenil Enrique Cares - Universidade de Brasília

Co-advisor – Dr. Thales Lima Rocha- EMBRAPA CENARGEN.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país de proporções continentais, com a maior reserva de terras agricultáveis e condições climáticas variáveis, permitindo que o país ocupe posição de destaque no cenário agrícola mundial (CNA, 2018; CONAB, 2019). O agronegócio é um dos principais pilares da economia brasileira, onde no ano de 2018 foi responsável por 22% do PIB total do país, 44% das exportações e 32% dos empregos (CNA, 2018), sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores mundial de café, cana de açúcar, álcool, sucos de frutas, soja, milho, carne bovina, carne de frango, tabaco, couro, milho, arroz, frutas frescas, cacau, castanhas, nozes, suínos, pescados, além de possuir o maior rebanho bovino do mundo (Velasco & Capanema, 2006).

A safra de 2018/2019 teve a área plantada estimada em 63.217,2 milhões de hectares, tendo um aumento de 2,4% em relação à safra anterior, com um acréscimo de 1.495,4 milhões de hectares. A estimativa da produção de grãos para essa safra é de 242,1 milhões de toneladas, com uma variação positiva de 6,4% em relação à safra passada (CONAB, 2019).

O desempenho positivo do país no agronegócio é atribuído em grande parte ao desenvolvimento científico-tecnológico e a utilização de técnicas modernas na atividade agrícola, porém grande parte dessa produção é severamente reduzida devido ao ataque de fitopatogenos (Velasco & Capanema, 2006; Adegbite, 2011; Mitkowski & Abawi, 2003).

Os nematoides figuram entre os principais grupos de fitopatogenos, estando entre as pragas mais prejudiciais em áreas de agricultura intensiva no Brasil, afetando culturas de grande relevância econômica (Mitkowski & Abawi, 2003). Acredita-se que todas as espécies cultivadas sofrem danos causados por pelo menos, uma espécie de nematoide, podendo algumas culturas ser hospedeiras de mais de uma espécie (Sasser *et al.*, 1984).

Estes organismos são pequenos vermes que estão inseridos no filo Nematoda, apresentam um plano corporal simplório em formato de fio, configurando um dos grupos de animais mais abundantes da Terra, possivelmente devido sua alta capacidade de adaptação e resistência às adversidades ambientais e condições de hostilidade (Bergamin Filho *et al.*, 1995; Abad *et al.*, 2010).

O gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887 é composto por fitonematoides endoparasitas sedentários formadores de galhas radiculares, com mais de 3.000 espécies vegetais hospedeiras descritas na literatura (Abad *et al.*, 2003), integrando assim um dos grupos de patógenos mais agressivos para plantas no mundo (Trudgill & Blok, 2001). A ação danosa

desses organismos geram perdas de aproximadamente US\$ 150 milhões de dólares anuais, onde 95% dessas perdas estão associadas à ação de quatro espécies de *Meloidogyne*; *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 e *M. hapla* Chitwood, 1949 (Sasser *et al.*, 1984; Abad *et al.*, 2003; Bakhetia *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006), sendo *M. incognita* a espécie mais expressiva quanto às perdas econômicas em função da sua alta polifagia (Huang *et al.*, 2006).

As espécies do gênero *Meloidogyne* são consideradas as mais importantes dentre os fitonematoides, devido sua ampla distribuição geográfica e vasta gama de hospedeiros (Freitas *et al.*, 2001), onde várias espécies pertencentes a esse gênero também tem se destacado, como: *Meloidogyne paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996, *M. exigua* Göldi, 1887, *M. fallax* Karssen, 1996, *M. minor* Karssen, 2004, *M. chitwoodi* Golden, 1980, e *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (= *M. mayaguensis*) (Moens *et al.*, 2009). Os danos causados por estes fitopatógenos estão relacionados à formação de tumores nas raízes que interferem na capacidade de absorção, além das perdas indiretas pelo aumento da sensibilidade dessas plantas a alterações ambientais de qualquer natureza, tendo menor tolerância ao frio e á seca, com perda parcial na eficiência da utilização de alguns insumos, e maior suscetibilidade ao ataque de outras pragas e patógenos (Gonçalves, 2004; Ritzinger & Fancelli, 2006; Mitkowski & Abawi, 2003).

Os danos causados por *M. incognita* são severos devido sua alta capacidade reprodutiva, agressividade e especificidade no parasitismo (Bakhetia *et al.*, 2005). Esses organismos são capazes de atingir as mais diversas culturas, e a infestação desse patógeno no solo leva a limitações tanto na implantação quanto no desenvolvimento normal das plantas, podendo chegar até mesmo na impossibilidade de produção (Brass *et al.*, 2008). No Brasil a produção é reduzida em 20% devido a ação de fitonematoides, sendo espécies de *Meloidogyne* spp. responsáveis por pelo menos 75% dessas perdas (Lordello, 1976). Em levantamento realizado em áreas produtoras de hortaliças por Silva (1991) no estado do Maranhão foram identificadas a presença de *M. incognita* em quase 74% das áreas amostradas. Anwar & McKenry (2012) também em hortaliças no Paquistão, apontou a presença dessa espécie em 90% da amostragem realizada. Nematoides do gênero *Meloidogyne* também foram apontados como predominantes em quase 35% dos problemas causados por fitonematoides em plantas ornamentais e medicinais (Maciel & Ferraz, 1996; Costa *et al.*, 2001).

Em plantações de cana-de-açúcar observou-se a redução de 50% da produtividade no primeiro corte, e 10% nas sequeiras seguintes; em cada soqueira este patógeno pode provocar perdas que variam de 10 a 20 toneladas por hectare (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeacucar/arvore/CONTAAGO154711200516718.html>). Já no caso da soja na segunda safra, foram relatadas perdas de até 60% acarretadas por *M. incognita* nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso e São Paulo. Para as plantações de algodão, *M. incognita* pode causar perdas de até R\$ 25.000.000,00, sendo que o complexo nematoide-fungo (*Fusarium spp.*) registra perdas de 40% na produção.

Algumas estratégias são empregadas na tentativa de controlar esse fitoparasita, por meio de rotação de culturas, uso de variedades resistentes, manejo integrado de pragas/patógenos, uso do controle biológico, e principalmente através da aplicação maciça de defensivos agrícolas sintéticos (Chitwood, 2002; Mitkowski & Abawi, 2003; FAO, 2017a).

O Manejo Integrado de Nematoides (MIN) é uma estratégia promissora que tende a gerar bons resultados pois visa reduzir a população dos nematoides de maneira equilibrada com o menor prejuízo possível para a cultura e o meio ambiente. Entretanto, o M.I.N necessita de planejamento minucioso e gestão intensiva das culturas, pois as estratégias deverão ser combinadas, tais como medidas de exclusão, rotação de culturas, emprego de plantas antagonistas, controle químico, adubação verde, cultivares resistentes, pousio e controle biológico (Barker & Koenning, 1998; Gentz *et al.*, 2010). A rotação de culturas com a utilização de plantas antagonistas é efetivo para a redução das populações de fitonematoides, porém essa prática consequentemente também reduz os lucros (Dufour *et al.*, 2003; Ferraz & Freitas, 2004). A utilização de variedades com resistência genética é uma alternativa recomendável para o controle de nematoides, por ser uma das medidas mais eficientes, econômicas e de menor impacto ambiental no controle desse endoparasito. Porém o número dessas cultivares é bastante limitado (Dufour *et al.*, 2003; Ferraz & Freitas, 2004), além de que a resistência desenvolvida em uma cultivar não é necessariamente efetiva contra as diferentes raças de uma mesma espécie de nematoide, podendo essa resistência ser facilmente superada (Eisenback *et al.*, 1981). Já existem no mercado produtos formulados com ingredientes bióticos como princípios ativos, com efetividade para o controle de fitonematoides. Porém, apesar dessa alternativa contribuir positivamente para a diminuição de danos ambientais, e até mesmo se mostrar mais vantajosa do ponto de vista econômico quando comparado aos métodos químicos convencionais, a estratégia mais usual ainda está

centrada na utilização de nematicidas sintéticos que podem comprometer a saúde humana e o meio ambiente (Coimbra & Campos, 2005; Abad *et al.*, 2008; Mitkowski & Abawi, 2003; <http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e08.htm>, acessado em 03-08-2017).

O uso do controle químico apresenta o inconveniente desses produtos serem no geral, altamente tóxicos, trazendo risco de contaminação para o meio ambiente, incluindo os recursos hídricos. Esses produtos, podem levar a perdas na biodiversidade, além do alto custo, do número reduzido de princípios nematicidas disponível no mercado, e a perda progressiva da eficácia desses produtos com o número crescente de aplicações (Dong & Zhang, 2006; FAO: Who, 2016).

Nos últimos anos ocorreu uma drástica redução na lista de defensivos agrícolas legalmente comercializados na União Europeia, em decorrência da legislação que foi promulgada em 1993 (Diretiva 91/414/CEE) e com vigência até dezembro de 2008. Durante esse período, cerca de 704 substâncias ativas foram banidas do mercado (Karabelas *et al.*, 2009). Em 2009 a União Européia definiu novas regras para o uso de agrotóxicos, visando reduzir os riscos e os impactos sobre a saúde humana e o meio ambiente, de acordo com a Diretiva 2009/128/CE (EC, 2013). Adicionalmente, a EPA (Environmental Protection Agency) nos EUA também decidiu aumentar o controle dos registros de defensivos e do nível de tolerância considerado seguro. Em contrapartida, no Brasil a lista de agroquímicos liberados cresceu consideravelmente, tendo atingido o recorde em 2018 de novas liberações dos últimos 14 anos, com 450 novos registros de defensivos. Somente nos dois primeiros meses de 2019, 74 novos produtos foram registrados, sendo 21 desses considerados extremamente tóxicos, 11 altamente tóxicos, 19 medianamente tóxicos, sendo apenas 7 considerados pouco tóxicos à saúde humana, e 2 pouco perigosos para o meio ambiente (ABRASCO, 2019).

Atualmente observa-se uma tendência da proibição dos defensivos mais tóxicos por parte dos países desenvolvidos, e o surgimento de novas alternativas de controle para fitopatógenos com compostos inovadores e sustentáveis pode contribuir efetivamente para a redução considerável da utilização desses químicos em todo o mundo. Deste modo, a restrição ao uso de nematicidas sintéticos em culturas agrícolas deve ser incentivado, considerando a necessidade de proteger a saúde humana, animal, e diminuir os impactos nocivos ao meio ambiente. Diante desse cenário, existe uma demanda crescente na busca de estratégias ambientalmente seguras à base de substâncias químicas naturais inovadoras que possuam ampla diversidade estrutural e biológica (Dixon, 2001; Newman *et al.*, 2003; Clardy,

& Walsh, 2004), visando a obtenção de novos produtos nematotóxicos (Rocha *et al.*, 2013 a, b).

O Brasil detém uma das maiores biodiversidades do planeta e representa uma importante fonte de produtos naturais à base de plantas. Logo, nos últimos 20 anos, um amplo número de espécies vegetais tem sido relatados por conterem uma variedade de compostos com ações fungicidas, bactericidas, inseticidas e nematotóxicas (nematicida e/ou nematostática) (Oliveira *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Diversas características associadas a compostos naturais com potencial biotecnológico como a especificidade bioquímica, a alta diversidade/estabilidade química, tornam essas estruturas base para a descoberta de novos biocidas, diferenciando-os dos componentes sintéticos (De Waele & Elsen, 2007). Estes compostos podem apresentar algumas vantagens sobre os defensivos sintéticos, tais como: oferecer compostos que as pragas e patógenos ainda não podem inativar; menos concentrados e, portanto menos tóxicos do que compostos puros, além de sofrerem biodegradação mais rápida por serem derivados de recursos renováveis e possuírem múltiplos modos de ação (Pascual-Villalobos, 1996; Ferraz & Freitas, 2004).

Estudos da ação de extratos obtidos a partir de plantas demonstraram efeito nematotóxico bastante efetivo. Esses efeitos têm sido relacionados à presença de metabólitos, tais como: alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides, aminoácidos, glicosídeos entre outros. As plantas apresentam dois tipos de metabolismo: o primário e o secundário. No metabolismo primário encontram-se compostos como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, sendo responsáveis por desempenharem funções essenciais no metabolismo das plantas como; crescimento, desenvolvimento, manutenção das células, respiração, reprodução e fotossíntese. Já o metabolismo secundário apresenta substâncias de natureza química variadas, não necessariamente associadas a funções celulares vitais, podendo apresentar diversas funções e aplicações (Di Stasi, 1996; Taiz & Zeiger, 1998; Marzzoco & Torres, 2007; Zhao *et al.*, 2013). Os compostos que são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas desempenham importante papel na interação com o meio ambiente, podendo estar associados à diferenciação celular, à regulação do crescimento, à mediação das interações entre plantas e outros organismos e, principalmente à proteção da planta (Dobson, 2004).

A família Solanaceae apresenta ampla distribuição mundial, sendo representada por mais de 2000 espécies distribuídas em cerca de 100 gêneros, sendo que no Brasil, esta família apresenta aproximadamente 34 gêneros e 449 espécies (215 endêmicas) (Stehmann *et al.*, 2016). A família Solanaceae é considerada um dos maiores grupos dentro das angiospermas,

sendo relatadas em diversos estudos como plantas ricas em metabólitos secundários bioativos, como os alcaloides esteroidais, alcaloides do tipo tropano, alcaloides piridínicos, vitanolídeos, sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcaloides, flavonoides entre outros (Silva *et al.*, 2003). Nessa família estão contidas espécies de vários gêneros de importância econômica, com potencial agrícola, como as dos gêneros *Solanum*, *Physalis* e *Capsicum*, como para fins ornamentais, as dos gêneros *Petunia*, *Solandra* e *Cestrum* (Hawkes, 1999). Análises fitoquímicas indicam a presença significativa de alcaloides e de flavonoides em uma diversidade de plantas de vários gêneros dessa família, em especial no gênero *Solanum* (Silva *et al.*, 2003). Também tendo sido identificada em algumas espécies de outros gêneros, resistência associada a insetos e a nematoides (Hawkes, 1999; Checon, 2011). Vários extratos obtidos de plantas da família Solanaceae já tiveram sua atividade biológica determinada, como por exemplo, extratos metanólicos de *Solanum paniculatum* L. os quais apresentaram atividade para as larvas de *Artemia salina* (L.) (Silva *et al.*, 2007) e de *Solanum americanum* Mill., popularmente utilizado no controle de nematoides (Mors *et al.*, 2000).

Considerando os dados da literatura, a variedade de metabólitos secundários pertencentes a distintas classes químicas e o potencial biotecnológico presente em plantas da família Solanaceae (Hawkes, 1999), os objetivos desta pesquisa foram: avaliar a ação nematotóxica de extratos cru aquosos (ECA's) de sementes e raízes de quatro acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae, por meio de bioensaios *in vitro* para selecionar o de maior atividade sobre juvenis de segundo estágio (J2) de espécies de nematoide do gênero *Meloidogyne* spp., fracionar via cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com coluna de exclusão molecular do ECA mais efetivo no controle de (J2) de *M. incognita*; realizar testes de toxicidade em eritrócitos bovinos, termoestabilidade e especificidade utilizando organismos não alvo; purificar a fração com a atividade nematicida concentrada via HPLC utilizando coluna de adsorção por fase reversa, para posterior identificação das massas moleculares dos componentes químicos das frações ativas via MALDI-TOF, realizar testes *in vitro* e *in vivo* para validar a atividade nematicida do ECA e da fração ativa, avaliar em condições de casa de vegetação a reação de resistência e/ou suscetibilidade dos acessos utilizados por meio da mensuração do fator de reprodução (RF); identificar preliminarmente as classes químicas desses compostos ativos, abrirão novas perspectivas para o controle de *M. incognita*, um dos mais importantes fitopatógenos da agricultura no Brasil e no mundo.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa é prospectar e avaliar o potencial nematotóxico de extratos crus aquosos (ECA's) e frações cromatográficas, obtidos a partir de sementes e raízes de acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae contra *Meloidogyne incognita* como alternativa ao controle químico convencional.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos crus aquosos (ECAs), e frações cromatográficas, utilizando sementes e raízes de acessos de uma espécie de Solanaceae, e testá-los quanto as suas atividades nematotóxicas em bioensaios de viabilidade e recuperação *in vitro* dos nematoides *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*;
- Avaliar a reação dos acessos utilizados nesse estudo, ao nematoide *M. incognita*;
- Confeccionar uma curva com os ECA's ativos, buscando determinar a menor concentração efetiva e a dose letal inibitória (DL₅₀) contra juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*;
- Submeter os ECA's a testes de especificidade contra organismos não-alvos, termoestabilidade, citotoxicidade e fitotoxicidade;
- Identificar preliminarmente as classes químicas e os seus respectivos compostos a partir das frações ativas obtidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A introdução dos defensivos agrícolas como potencializadores de produção

A população mundial tem crescido consideravelmente nas últimas décadas, sendo estimadas em 7,6 bilhões de pessoas segundo o relatório das Nações Unidas “Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2019”. Esse mesmo relatório aponta crescimento anual de quase 83 milhões de pessoas, sendo projetada uma população de 8,6 bilhões de pessoas em 2030, superando 12,7 bilhões até 2100 (ONU, 2019).

Thomas Robert Malthus em 1798, postulou sobre a tendência geométrica do aumento populacional humano, e o aumento na produção de alimentos de maneira aritmética ou linear, sendo inevitável um futuro em que a produção alimentícia não conseguiria acompanhar tal demanda populacional (Oerke, 1999b). Esse crescimento populacional exponencial está diretamente relacionado com uma maior demanda mundial pelo consumo de alimentos, sendo necessária a otimização da produção agrícola na medida dessas taxas de crescimento. Entretanto, essa produção agrícola é severamente reduzida devido alguns fatores limitantes, tais como: o fenômeno da diminuição das áreas apropriadas para o cultivo, bem como as perdas de produção devido ao ataque de uma variedade de pragas e fitopatógenos, incluindo insetos, ácaros, nematoides, fungos, vírus e bactérias, além da competição interespecífica com plantas invasoras (Oerke., 1999a; Jardim *et al.*, 2009).

Tendo em vista o crescimento da produção, bem como uma diminuição das perdas, algumas medidas têm sido adotadas, sendo os métodos de proteção disponíveis fortemente dependentes de produtos químicos (Oerke, 1994). Historicamente, o modelo de produção agrícola brasileiro baseia-se principalmente na utilização desses defensivos fitossanitários para compensar os problemas no processo produtivo, tendo sido introduzidos como tentativa de corrigir as necessidades do solo e prevenir as pragas que prejudicam a produtividade (Peres *et al.*, 2005; Veiga, 2007). Talvez, seja essa uma das justificativas para o aumento na venda desses químicos no Brasil nos últimos anos, o que tornou o país um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Veiga, 2007).

3.2 Produtos de proteção fitossanitária

Os produtos de proteção fitossanitária, também são conhecidos como agroquímicos, defensivos agrícolas, agrotóxicos, praguicidas, pesticidas ou biocidas, entre outros termos. Esses

químicos têm taxa de consumo anual crescente em termos mundiais, sendo que a venda desses produtos no Brasil aumentou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para US\$ 7 bilhões em apenas 7 anos, entre 2001 e 2008 (SINDIVEG, 2009). Esse crescimento justifica-se pelo fato de que esses produtos são amplamente utilizados pelos produtores rurais para evitar ou controlar o aparecimento de doenças em suas lavouras (Veiga, 2007). Segundo Peres e colaboradores (2005), o crescimento da produtividade no Brasil estaria diretamente relacionado com o uso desses produtos no campo, sendo eles a alternativa mais acessível para o aumento dessa produtividade.

Os defensivos fitossanitários são definidos como compostos que possuem alta variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos, e que foram desenvolvidos para potencializar uma ação biocida, ou seja, foram desenvolvidos para matar, exterminar e combater as pragas agrícolas (Veiga, 2007).

Segundo a legislação brasileira, Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989, os defensivos fitossanitários são definidos como sendo agentes químicos, físicos ou biológicos destinados à proteção de culturas agrícolas, que sejam utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento desses produtos, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, assim como de outros ecossistemas, ambientes urbanos, hidrícos e ambientais. Esses defensivos têm por finalidade preservar as plantas contra a ação danosa de fatores bióticos nocivos. Entre esses defensivos estão inclusos os desfolhantes, dessecantes, substâncias fitoreguladoras, fertilizantes sintéticos, hormônios, fungicidas, inseticidas, bactericidas, acaricidas, e os nematocidas, sendo excluídos dessa definição os produtos administrados a animais para estimular crescimento ou modificar comportamento reprodutivo (BRASIL, 1989; Gonçalves, 2004; BNDES, 2006; BRASIL 2018). A lei supracitada é regulamentada pelo decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002, quanto às responsabilidades atribuídas a cada integrante da cadeia produtiva, bem como aos aspectos referentes à pesquisa, experimentação, produção, embalagem, rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda, utilização, importação, exportação, destino dos resíduos, registro, controle, e sua classificação toxicológica (BRASIL, 2002; BNDES, 2006).

A classificação toxicológica dos defensivos fitossanitários é de responsabilidade do Ministério da Saúde, sendo também regulamentada pela Lei 7.802/1989. Essa classificação é feita de acordo com o potencial tóxico desses produtos, sendo a dose letal inibitória (DL_{50}), dose necessária para matar 50% de uma população sob determinadas condições, a maneira mais comum para se expressar o nível de toxicidade (Gasparin, 2005).

O registro de novos defensivos fitossanitários no Brasil exige a avaliação de três órgãos federais; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O MAPA analisa a eficiência do produto para sua utilização na agricultura, o IBAMA se ocupa do potencial poluidor, enquanto a ANVISA examina a toxicidade do agroquímico e seus efeitos sobre a saúde humana, estabelecendo ainda as condições de segurança para a utilização do mesmo (ANVISA, 2018).

Os produtos de proteção fitossanitário são avaliados quanto aos seus riscos para a saúde humana e meio ambiente, levando em consideração as características físico-químicas, e de estudos toxicológicos e ecotoxicológicos. Assim, esses produtos são distribuídos em diferentes categorias de acordo com o grau de periculosidade (Tabela 1); produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) (Ribas & Matsumura, 2009).

Tabela 1- Classificação dos agroquímicos de acordo com os efeitos à saúde humana.

| CLASSE TOXICOLÓGICA | GRUPOS | DL 50 (mg/kg) | DOSE CAPAZ DE MATAR UM ADULTO | FAIXA |
|---------------------|---------------------|------------------|-------------------------------------|----------|
| Classe I | Extremamente tóxico | ≤ 5 | 1 pitada/ algumas gotas | Vermelha |
| Classe II | Altamente tóxico | entre 5 e 50 | Algumas gotas/ 1 colher de chá | Amarela |
| Classe III | Medianamente tóxico | entre 50 e 500 | 1 colher de chá/ 2 colheres de sopa | Azul |
| Classe IV | Pouco tóxico | entre 500 e 5000 | 2 colheres de sopa/ 1 copo | Verde |
| | Muito pouco Tóxico | > 5000 | 1 copo/ 1 litro | |

Fonte: adaptado de Gasparim (2005).

Historicamente o uso de substâncias químicas na agricultura surgiu principalmente para o controle de insetos, tendo registros da utilização de arsênico e enxofre no controle desses organismos pelos romanos e gregos. Registros históricos apontam a utilização de arsênico na Idade Média, e a utilização de algumas substâncias orgânicas a partir do século XVI (Gonçalves, 2004; Gasparin, 2005). Os primeiros estudos sobre a utilização de substâncias para a proteção de plantas só começou a partir do século XX, dando início ao desenvolvimento e utilização comercial de diversos produtos à base de cobre, chumbo, mercúrio, entre outros, com destaque para a descoberta do organoclorado diclorodifeniltricloreto (DDT), que converteu-se em agroquímico universal amplamente utilizado, dando início à implementação maciça desses produtos nas práticas agrícolas (Gasparin, 2005).

No entanto, no final da década de 1950, os efeitos danosos dos agroquímicos começaram a ser notados, como a indução de resistência nos organismos alvos, persistência e acúmulo do

resíduo por longos períodos no ambiente, distúrbios ambientais como a perda de biodiversidade, alterações em ciclos de polinização, morte de espécies, além da capacidade de migração desses resíduos no ambiente (Martins, 2000; FAO: Who, 2016). Sabe-se atualmente que esses químicos apresentam risco em potencial para todos os organismos vivos, e que podem ser absorvidos via dérmica, inspirados pelos pulmões ou ingeridos em produtos contaminados.

O Ministério da Saúde apontou nos anos de 2007 a 2015, mais de 82 mil casos de intoxicação por agroquímicos no Brasil, devido à ausência de equipamentos de proteção individual (EPI) e o despreparo para o manuseio e aplicação desses produtos (Ministério da Saúde, 2018). Os indivíduos mais suscetíveis à intoxicação são em sua grande maioria os trabalhadores agrícolas, crianças, mulheres em idade reprodutiva, gestantes e lactantes, idosos e pessoas com vulnerabilidade genética e biológica (Who, 2010). Os efeitos adversos dos agrotóxicos à saúde dependem de suas características químicas, da quantidade do produto absorvido ou ingerido, do tempo de exposição, além do tempo transcorrido até o atendimento médico, e das condições gerais de saúde da pessoa contaminada (Ministério da Saúde, 2018). São diversos os danos causados por esses químicos como; alergias, distúrbios cardiovasculares, endócrinos, gastrointestinais, neurológicos, reprodutivos, imunológicos, respiratórios, desenvolvimento de carcinomas, podendo chegar até mesmo à morte do indivíduo (Who, 2010).

A diagnose de doenças de plantas no campo é uma tarefa difícil e um diagnóstico incorreto tem induzido à utilização de agroquímicos de maneira e em quantidades inadequadas, gerando resultados duvidosos e elevando os riscos (SINDIVEG, 2011). A capacidade da água e do solo em absorver substâncias produzidas pela indústria é limitada, sendo alguns ambientes mais vulneráveis à contaminação pelo uso indiscriminado de agroquímicos, como por exemplo; as bacias hidrográficas, rios e florestas. Nesse sentido, faz-se necessário a busca por soluções que sanem essa problemática, além de otimizar a produção e os rendimentos, onde o modelo de agricultura mais sustentável deve ser encorajado, pois o sistema atual de produção está levando a uma inevitável catástrofe ecológica (Oerke, 1999a).

3.3 Nematoides fitopatogênicos

Os nematoides representam os indivíduos mais abundantemente encontrados dentre os animais multicelulares e perdem apenas para os artrópodes em termos de diversidade (Wylie *et al.*, 2004; Cares *et al.*, 2012). Desempenham importante função na cadeia alimentar, participando de processos ecológicos fundamentais na decomposição e ciclagem de nutrientes do solo (Lordello, 1984; Tihohod, 1993; Freitas *et al.*, 2004;). Esses animais estão inseridos no

reino Animalia, apresentam um corpo pseudocelomado, não segmentado, com simetria bilateral. Possuem os sistemas; digestivo, reprodutor, excretor e nervoso completos. A cutícula do nematoide corresponde ao exoesqueleto e é responsável pela forma, além de exercer função de proteção, mobilidade, barreira à permeabilidade, e é por onde são feitas as trocas gasosas com o meio (Blaxter *et al.*, 1998). Essa cutícula pode ser morfológicamente lisa ou anelada, sendo este um fator decisivo para o agrupamento taxonômico dos nematoides. Quando esses organismos são fitoparasitas, tanto os ectoparasitas quanto os endoparasitas são dotados de um estilete que é uma estrutura fina e alongada, utilizada para romper a parede celular de plantas hospedeiras.

Segundo Abad e colaboradores (2010) existem cerca de 25.000 espécies de nematoides já descritas na literatura, estimando-se que existam ainda cerca de meio milhão de espécies não identificadas, sendo a grande maioria desses organismos de vida livre, porém alguns são parasitas de animais e plantas (Blaxter, 2003; Abad *et al.*, 2010). A maioria das plantas terrestres e animais estão associados com pelo menos uma espécie de nematoide parasita, onde análises filogenéticas moleculares tem mostrado que esse parasitismo surgiu em pelo menos 15 momentos independentes (Blaxter & Koutsovolus., 2015). Algumas espécies de nematoides parasitas vegetais se ocupam das partes aéreas das plantas como; folhas, caules, flores e sementes, mas a maioria dos fitonematoides são de órgãos subterrâneos de plantas como; raízes, rizomas, tubérculos, e bulbos (Monteiro *et al.*, 1995; Moura, 1996; Abad *et al.*, 2010). Os nematoides parasitas de plantas correspondem a cerca de 15% das espécies descritas dentro do filo Nematoda (Moreira, 2017), e são considerados por muitos especialistas em nematologia agrícola “os inimigos invisíveis das plantas” (Ferraz & Brown, 2016).

Os nematoides fitopatogênicos representam problema crítico para agricultura mundial devido às vastas perdas causadas nas culturas de grande relevância econômica como café, cana-de-açúcar, soja, feijão, fumo, frutíferas e olerícolas, na qual regiões com altos índices de infestação ficam impossibilitadas de serem cultivadas (Campos, 1992; Mitkowski & Abawi, 2003); Santos, 2011). Estes fitonematoides podem causar desde danos suaves até a destruição total da lavoura, e por serem organismos de difícil controle causam perdas anuais estimadas em 157 bilhões de dólares (Ritzinger & Fancelli, 2006; Abad *et al.*, 2008; Bakhietia *et al.*, 2008). Eles são capazes de promover a destruição do sistema radicular das plantas, formando nodulações nas raízes (Ritzinger & Fancelli, 2006), promovendo diminuição da produtividade, redução na quantidade das cultivares, na estatura das plantas e na qualidade dos produtos, sendo altamente prejudiciais para a agricultura (Lordello, 1984; Hussey & Williamson, 1998).

Os nematoides fitoparasitas expelem efetores por meio de glândulas especializadas, que são os principais responsáveis pelo sucesso no parasitismo, sendo esses efetores em sua grande maioria proteínas que reprograma o metabolismo da hospedeira, impedindo a execução de respostas de defesa da planta, além de estarem diretamente relacionados com a capacidade do nematoide em completar o seu ciclo de vida (Davis *et al.*, 2004; Caillaud *et al.*, 2008; Haegeman *et al.*, 2012; Mitchum *et al.*, 2012).

Os prejuízos econômicos relacionados com a infestação das culturas por esses organismos são exorbitantes, sendo que a maioria das infestações, cerca de 95% estão associadas a interação com a ação de ao menos uma dentre 4 espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, conhecido como o nematoide formador das galhas radiculares (Sasser *et al.*, 1984; Bakhetia *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2008).

3.4 Nematoides das galhas: Gênero *Meloidogyne*

O gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, pertecente ao Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae (DeLey & Blaxter, 2003; Karssen & Moens, 2006; Cepulité *et al.*, 2018).

Os nematoides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne* são endoparasitas sedentários obrigatórios das raízes de várias plantas (Abad *et al.*, 2003; Castagnone-Sereno, 2006), sendo as espécies pertencentes a esse gênero consideradas as mais importantes dentre os fitonematoides, devido sua ampla distribuição geográfica e vasta gama de plantas hospedeiras, com mais de 3000 espécies hospedeiras registradas na literatura (Freitas *et al.*, 2001; Abad *et al.*, 2003). Esses organismos estão entre os patógenos mais agressivos para plantas no mundo (Trudgill & Blok, 2001), e podem ser encontrados nas mais diversas temperaturas. Ainda apresentam preferências por áreas tropicais com temperaturas acima de 28 °C, sendo algumas espécies normalmente encontradas em ambientes com determinadas características ambientais, como por exemplo o *M. arenaria*, comumente encontrada em locais de solos arenosos, *M. hapla*, geralmente é encontrada em condições de temperaturas mais amenas, abaixo de 12°C; *M. javanica* e *M. incognita* que são as mais bem adaptadas às diferentes condições climáticas, sendo bastante cosmopolitas (Embrapa Soja, 2002).

Atualmente, o gênero *Meloidogyne* é composto por mais de noventa espécies, sendo algumas de grande importância econômica, na qual os nematoides desse gênero como um todo,

representam uma grande ameaça à produção agrícola mundial (Perry *et al.*, 2009; Santos, 2011; Cepulité *et al.*, 2018). Os organismos integrantes desse gênero apresentam dimorfismo sexual acentuado, sendo a fêmea sedentária e globosa, e os machos vermiformes de vida livre no solo.

As espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são denominadas de nematoides das galhas, devido ao principal sintoma encontrado nas plantas infectadas, com a presença de nodulações radiculares, em decorrência de processos de hipertrofia e hiperplasia das células do parênquima vascular e cortical das raízes, decorrentes das secreções esofagianas desses nematoides (Cordeiro *et al.*, 2005; Jammes *et al.*, 2005). Essas galhas radiculares ocasionam o desequilíbrio na capacidade de absorção, resultando em significativa redução dos nutrientes e água disponíveis para a planta, como resultado dos danos causados no sistema radicular. Na figura 1 são apresentadas as alterações desencadeadas nas plantas parasitadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que resultam em danos para a hospedeira (Asmus, 2001).

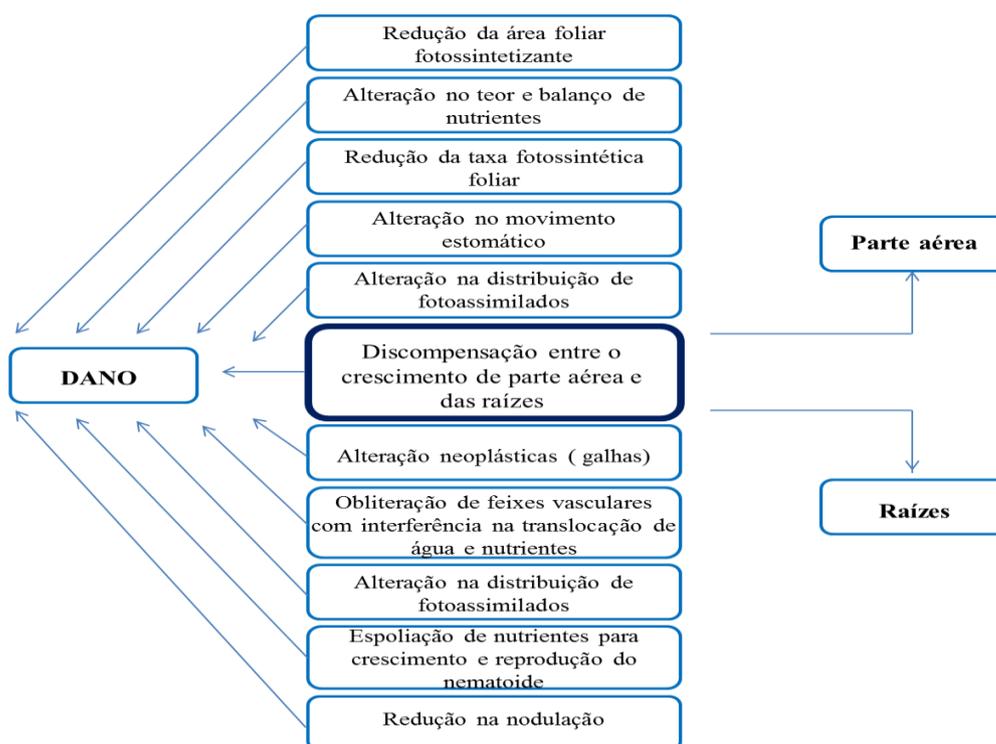


Figura 1- Mecanismos envolvidos no parasitismo de *Meloidogyne* sp. que resultaram em dano para a hospedeira. Fonte: adaptado de Asmus (2001).

As plantas que apresentam altos índices de infecção são substancialmente enfraquecidas, apresentando consequentemente baixos rendimentos na produção (Ritzinger & Fancelli, 2006; Caillaud *et al.*, 2008; Mitkowski & Abawi, 2003). Os sintomas causados pelos nematoides das

galhas estão geralmente relacionados ao aparecimento de manchas amareladas na folhagem, clorose, murcha das plantas durante os períodos quentes do dia, queda foliar precoce, perda prematura dos frutos, declínio e outros aspectos que remetem à suspeita de deficiência nutricional (Freire & Cardoso, 1996; Brass *et al.*, 2008). A severidade do ataque dependerá da suscetibilidade da hospedeira, da espécie e raça do nematoide envolvido no ataque, do tipo de solo, umidade, e o potencial de inóculo (Embrapa Soja, 2002).

Esses organismos interagem com seus hospedeiros de maneira marcante, pois são capazes de manipular as funções desses hospedeiros em benefício próprio, possuindo estratégias para infectar milhares de espécies vegetais de maneira similar, provavelmente por meio da manipulação de elementos fundamentais para o desenvolvimento da planta (Caillaud *et al.*, 2008). As secreções desses nematoides sedentários promovem alterações na expressão gênica das hospedeiras, induzindo as células das raízes a uma rediferenciação celular, estabelecendo os chamados sítios de alimentação, cuja principal função é suprir os nutrientes necessários para esses fitonematoides até sua reprodução (Gheysen & Fenoll, 2002; Puthoff *et al.*, 2003; Jammes *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2008; Caillaud *et al.*, 2008).

Dentre os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, a espécie *M. incognita* é considerada a mais expressiva quanto às perdas econômicas (Huang *et al.*, 2006), por ser mais disseminada, capaz de afetar quase todas as plantas cultivadas, tendo alto poder destrutivo, eliminando praticamente todas as raízes laterais, ocasionando fendas no córtex, sendo de difícil controle (Trudgill & Blok., 2001; Agrios, 2005; Cepulité *et al.*, 2018).

Essa espécie de fitonematoide é tão importante, que os dois primeiros genomas sequenciados de nematoides fitoparasitas, foram de duas espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, sendo essas espécies; *M. incognita* (Abad *et al.*, 2008) e *M. hapla* (Opperman *et al.*, 2008).

3.5 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Esses organismos apresentam um ciclo de vida simples, que geralmente se completa em duas a três semanas de acordo com a espécie e condições ambientais (Abad *et al.*, 2010). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* apresentam quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4), sendo o juvenil de segundo estágio de vida livre (J2), a única forma infectante para a planta (Abad *et al.*, 2010). Esses juvenis são atraídos e penetram na zona de alongação da raiz liberando secreções esofágicas, e perfurando a parede celular da hospedeira com o estilete (Backetia, 2005; Abad *et*

al., 2008). Dentro da raiz, eles migram entre as células até alcançar o cilindro vascular (Taylor & Sasser, 1983; Abad *et al.*, 2008), onde promovem a formação de um complexo sítio multinuclear de alimentação, que será sua fonte de alimentos para que possam completar o seu ciclo de vida (Vanholme *et al.*, 2004). O início da alimentação pelo J2 em células parenquimáticas do protoxilema e profloema induz a diferenciação em células especializadas, denominadas de células gigantes, tendo o início da fase sedentária (Eisenback & Triantaphyllou, 1991; Moens *et al.*, 2009).

A duração do ciclo de vida de *M. incognita* (Figura 2), irá depender da hospedeira e dos fatores ambientais como; temperatura e umidade, podendo variar de 20 a 28 dias (Agrios, 2005; Abad *et al.*, 2010). As fêmeas maduras fazem a postura de ovos (aproximadamente 500 ovos por ciclo), envoltos numa matriz gelatinosa glicoproteica na região cortical da raiz parasitada, sendo essa matriz responsável pela proteção dos ovos contra as adversidades ambientais e predação (Orion & Kritzman, 1991; Cordeiro, 1999). No interior do ovo é formado o juvenil de primeiro estágio J1, que ainda dentro do ovo irá passar pela primeira ecdise, e originar o juvenil de segundo estágio J2 (Cepulité *et al.*, 2018). Os J2 penetram as raízes na zona meristemática, migram intercelularmente até a zona de alongação em direção ao cilindro vascular, e ao atingi-lo, esses organismos induzem o desenvolvimento das células nutridoras (Cepulité *et al.*, 2018). Os estádios J3 e J4 são formados já no interior da raiz das plantas hospedeiras, apresentam formato salsichoide, e são desprovidos de estilete. O estágio J4 também é conhecido como pré-adulto, fêmea ou macho, sendo que a maioria dos juvenis que penetram a raiz dará origem a fêmeas (Moura, 1996; Williamson & Hussey, 1996; Abad *et al.*, 2003).

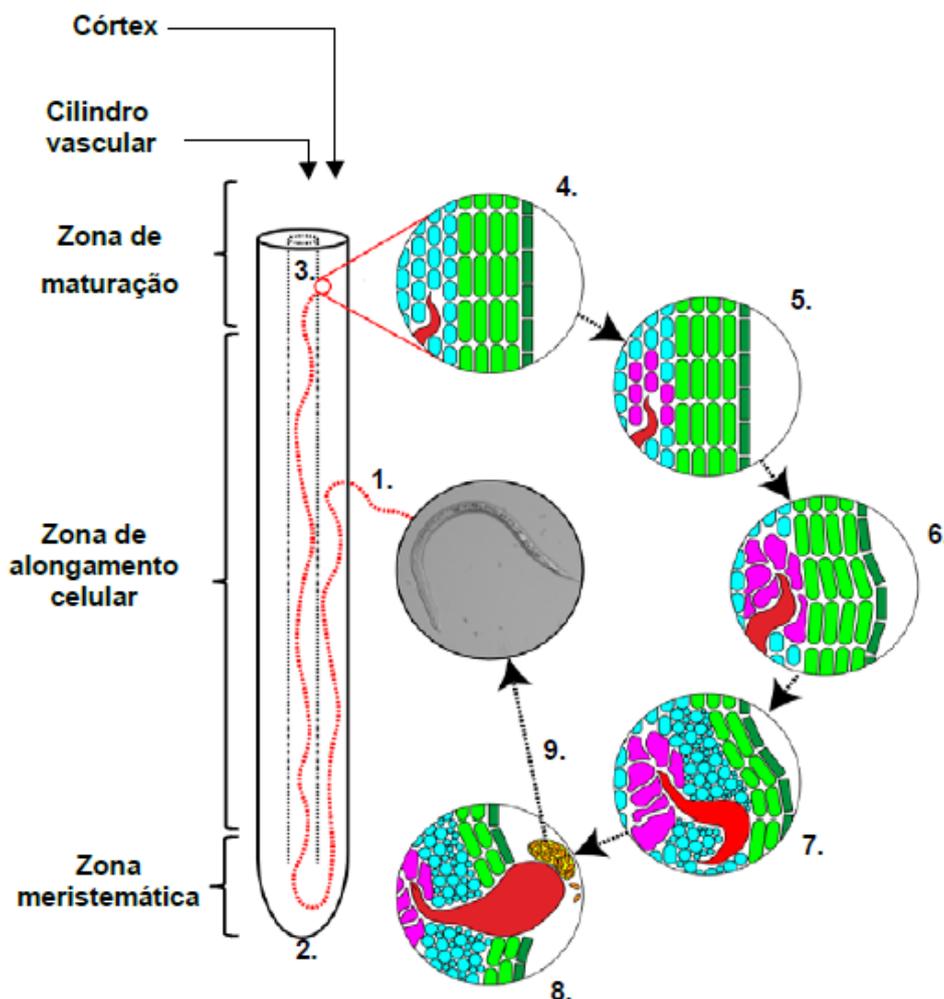


Figura 2 – Etapas do ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* - **1.** Penetração na raiz; **2.** Migração até a zona meristemática para atingir o cilindro vascular; **3 e 4.** Estabelecimento do sítio de alimentação; **5.** transformação das células parenquimáticas e células gigantes; **6.** Desenvolvimento das células gigantes; **7.** Processos hiperplásticos do meta-floema; **8.** Oviposição; **9.** Ecloração dos juvenis. Fonte: Costa (2018).

O nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*, é um parasita sedentário obrigatório que se reproduz por partenogênese mitótica, sendo o seu parasitismo considerado bastante especializado (Blaxter, 2003). Esse nematoide é capaz de influenciar a maquinaria metabólica da planta em seu próprio benefício, sendo as células multinucleadas estruturas induzidas por parasitas capazes de alterar o desenvolvimento biológico da hospedeira (Blaxter & Koutsovolus., 2015). Nesse sentido, ao analisar o genoma dessa espécie, foi constatada uma diversidade de enzimas que degradam a parede celular de plantas, sem precedentes em qualquer parasita animal que possua a sequência disponível, o qual acredita-se, que tais enzimas tenham se originado de múltiplas transferências horizontais de genes provenientes de bactérias (Abad *et al.*, 2008). O genoma do *M. incognita* codifica nove proteases da subfamília S-16, sendo apenas três dessas

também identificadas no genoma de *Caenorhabditis elegans* Emery, 1869, onde a maioria dessas proteases atuam na regulação de secreções proteicas por bactérias fitopatogênicas, podendo ter papéis análogos em *M. incognita* (Abad *et al.*, 2008).

3.6 Métodos alternativos de controle de fitonematoides

Alguns métodos podem ser empregados para o controle desses fitoparasitas, como rotacionar as culturas, utilizar plantas antagonistas, armadilhas, não hospedeiras, ou cultivares resistentes, solarização, alqueive, manejo integrado de pragas, utilização de produtos biológicos de origem fúngica ou bacteriana, e principalmente por meio da aplicação de produtos de proteção fitosanitários (Chitwood, 2002; Williamsom & Kumar, 2006; Wiratno *et al.*, 2009; Mitkowski & Abawi, 2003).; FAO, 2017a).

Essas estratégias são recomendadas em áreas infestadas, nas quais a melhor estratégia a ser adotada será delineada de acordo com o local, condições ambientais, culturas plantadas em campo, além dos fitonematoides associados aos danos. A utilização de plantas antagonistas em esquemas de rotação de culturas é uma alternativa positiva para a redução das fontes de inóculo, porém consequentemente reduz os lucros do produtor (Dufour *et al.*, 2003; Ferraz & Freitas, 2004). A utilização de variedades resistentes é igualmente recomendável para controlar doenças parasitárias de plantas, considerando as drásticas reduções que esses organismos promovem na produção de cultivares suscetíveis (Lindsey & Clayshulte, 1982; Thies, 1997). Alguns estudos têm revelado uma ampla utilização de variedades resistentes às diferentes espécies e raças de *Meloidogyne* em diversas culturas (Sasser, 1980; Trudgill & Blok., 2001). Contudo, o número dessas cultivares é bastante limitado, considerando a imensa variedade de espécies hospedeiras, bem como a diversidade genética relacionada à resistência em questão (Trudgill & Blok., 2001; Dufour *et al.*, 2003; Ferraz & Freitas., 2004), sendo a resistência geralmente direcionada a uma ou poucas espécies de nematoides considerados mais relevantes para aquela cultura (Williamson & Kumar, 2006; Ferraz & Freitas, 2008).

O método de solarização pode ser empregado para o controle de fitonematoides e outros organismos por intermédio da inativação térmica, resultante da combinação entre a temperatura atingida no solo e o tempo de exposição (Cruz & Silva, 2006). Essa técnica consiste na utilização da luz solar para aumentar a temperatura do substrato, sendo aplicada preferencialmente no verão (período de maior radiação anual). Para tanto, se utiliza um filme plástico de polietileno sobre o solo que deverá estar úmido e isento de planta, tendo em vista o aumento exponencial da

temperatura desse substrato, podendo atingir temperaturas acima de 40°C, que acabam sendo letais para esses organismos em determinadas profundidades (Oslen, 2000; Cruz & Silva, 2006). A solarização é um método eficiente que contribui efetivamente para a redução das populações de fitonematoides, sendo uma técnica simples e de baixo custo, porém não pode ser aplicada em todos os períodos do ano, e sua eficiência dependerá diretamente do nível de umidade do solo, além de alterar as propriedades químicas presentes no meio (Cruz & Silva, 2006).

O alqueive é uma prática que só é recomendável quando os níveis populacionais de nematoides se tornam alarmantes, sendo realizadas arações e gradagens periódicas, juntamente com a manutenção da área que deverá permanecer sem vegetação por um período mínimo de três meses (Perina *et al.*, 2015). Essa prática tende a reduzir a população de fitonematoides ao expor as camadas aradas de solo aos raios UV (Huang & Porto, 1988), onde a eficácia dependerá do tempo de exposição, temperatura, umidade do solo, e ausência de vegetação invasora na área tratada (Perina *et al.*, 2015). Nos períodos chuvosos seguidos de dias ensolarados a eficácia é ampliada pela presença de umidade no solo que influenciará na eclosão dos juvenis, onde a ausência de hospedeiras resultará na morte desses organismos por exaurir suas reservas energéticas (Dutra *et al.*, 2006).

O manejo integrado de fitonematoides é uma estratégia almejada, porém necessita de planejamento rigoroso, gestão intensiva da cultura, maior dispêndio de tempo, e pode ter custos superiores ao uso de defensivos agrícolas (Gentz *et al.*, 2010). Essa estratégia é resultado da combinação de várias práticas que visam o controle e a redução da população de fitonematoides no campo, ou a redução de sua capacidade infectiva, evitando sua disseminação, introdução em novas áreas de cultivo e seleção de espécies ou raças desses nematoides (Dropkin, 1980). O ideal é que as medidas de controle sejam empregadas de maneira integrada, potencializando resultados por meio da interação dos benefícios de diferentes técnicas (Barker & Koenning, 1998; Gentz *et al.*, 2010). A observação da presença de fitonematoides em áreas cultivadas é uma tarefa difícil, sendo geralmente feita somente após o aparecimento dos sintomas na parte aérea das plantas, quando os danos são bastante significativos (Perina *et al.*, 2015). Nesse sentido, as áreas produtoras devem estar sobre constante monitoramento, pois o sucesso do manejo integrado de fitonematoides está diretamente relacionado com a eficiência no controle das populações desses organismos nas áreas de cultivo, onde o foco é a redução dessas populações, considerando a alta polifagia de algumas espécies capazes de se multiplicar nas mais diversas hospedeiras (Perina *et al.*, 2015).

O controle biológico constitui tática fundamental em programas de manejo integrado, sendo essa estratégia bastante vantajosa se comparada com a utilização dos químicos convencionais, pois essa técnica é capaz de promover a redução de fitonematoides através da ação de outros organismos, como fungos e bactérias, que ocorrem naturalmente no solo ou poderão ser introduzidos (Howell, 2003; Khan & Kim, 2007; Sahebani & Hadavi, 2008). O controle biológico proporciona produtos que tem fatores bióticos como principais ingredientes ativos, podendo ser bastante efetivos para o controle de fitonematoides, reduzindo também os danos ambientais durante o manejo (Coimbra & Campos, 2005; Mitkowski & Abawi, 2003); FAO, 2017a).

Para o controle de fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, podem ser empregados o uso de fungos antagonistas, que têm ação parasitária sobre ovos, fêmeas e juvenis, por meio da colonização desses organismos por meio de conídios. O fungos do gênero *Trichoderma* Pers. por exemplo, são capazes de degradar a parede de ovos e do corpo de juvenis por intermédio do aumento da atividade de quitinases e proteases, que adicionalmente induzem reação de resistência na hospedeira, e da produção de substâncias tóxicas ao nematoide (Stirling, 1991; Sahebani & Hadavi, 2008; Machado *et al.*, 2012). Fungos de espécies de *Trichoderma* estão entre as mais utilizadas para o controle de fitopatógenos, por terem uma ampla distribuição geográfica, serem facilmente cultivados e observados no ambiente, apresentam crescimento rápido e em diferentes tipos de substrato, além disso, não são patogênicos a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982). Esses fungos são capazes de interferir nos processos vitais de fitopatógenos, inibindo-os por meio da competição, produção de metabólitos secundários, parasitismo direto, e da degradação de estruturas de resistência de patógenos, como escleródios, esporos e clamidósporos, que geralmente são difíceis de serem destruídos (Melo, 1998). São conhecidas 160 espécies de fungos nematófagos, distribuídos em cerca de 70 gêneros (Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995; Sharonn *et al.*, 2001; Soares, 2006). Além disso, vários desses fungos podem ser utilizados para a promoção de crescimento vegetal, devido sua versatilidade de ação, sendo demonstrado em muitos estudos o aumento não só no crescimento vegetal, como também da produtividade de diversas culturas (Resende *et al.* 2004; Almança, 2005; Fortes *et al.*, 2007; Jyotsna *et al.*, 2008; Bergamin Filho *et al.*, 2008; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

O controle químico ainda é a estratégia de controle mais utilizada, por ter o custo relativamente baixo e ser de rápida atuação (Abad, *et al.*, 2008; Mitkowski & Abawi, 2003). Entretanto, a utilização maciça desses produtos, podem acarretar vários e graves problemas por serem geralmente muito tóxicos, representando risco efetivo para a saúde humana e animal, além

de promover a contaminação dos recursos hídricos e do meio ambiente (Dong & Zhang, 2006; FAO: Who, 2016). Esses produtos apresentam desvantagens como o desenvolvimento de resistência no patógeno via seleção natural; morte de inimigos naturais e a conversão de pragas secundárias em primárias; o ciclo vicioso da aplicação de dosagens maiores e aumento na frequência de aplicação; a mobilidade dos agrotóxicos no ambiente e a sua capacidade de atingir não somente os organismos alvo; além de ameaçar a vida silvestre e a saúde humana a curto e longo prazo (Bergamin Filho, 2002). Os nematicidas sintéticos costumam ser altamente tóxicos, e sua degradação dependerá especialmente da camada de substrato em que se encontra, permanecendo ativos por mais tempo aqueles presentes em camadas mais profundas, podendo, por exemplo, contaminar os lençóis freáticos (FAO, 2017b). Neste cenário, o conceito de sustentabilidade baseado em química verde vem ganhado espaço, por intermédio do incentivo de medidas alternativas de controle, visando uma agricultura sustentável. Essas alternativas são capazes de manter os níveis de produtividade e qualidade, com baixo impacto ambiental e econômico, por meio da introdução de novos produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, com foco na substituição dos agroquímicos convencionais (Chaves *et al.*, 2012).

3.7 Plantas como fontes para a obtenção de biomoléculas

As plantas são ricas em diversas substâncias bioativas, que apresentam atividade contra um número limitado de espécies, sendo geralmente biodegradáveis, com baixa ou nenhuma toxicidade a mamíferos (Corrêa & Salgado, 2011). Algumas substâncias botânicas têm atividade inseticida conhecida, tais como, piretrinas, rotenona, nicotina, cevadina, veratridina, rianodina, quassinoides, azadiractina e biopesticidas voláteis. Esses últimos são geralmente, óleos essenciais presentes nas plantas aromáticas (Isman, 2000).

Acredita-se que na natureza existam cerca de 500.000 espécies de plantas, que são fontes de diversos produtos naturais de baixa massa molecular, conhecidos como compostos vegetais ou metabólitos (Dixon, 2001; Chitwood, 2002; Clardy & Walsh, 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Estas substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas apresentam funções biológicas e muitas desempenham um papel ecológico, com diversos usos e aplicações, tais como medicamentos, inseticidas, herbicidas, perfumes, entre outros (García & Carril, 2009). Mais de 10.000 metabólitos já foram identificados na natureza, sendo esse número estimado em apenas 10% da diversidade existente, e apesar do grande número de publicações indicando a atividade de diversos extratos contendo metabólitos secundários, pouco se sabe a respeito das

biomoléculas atuantes, e seus respectivos mecanismos de ação (Rocha *et al.*, 2006; Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

O conceito de produto natural é estendido a todos os compostos de origem biológica, que podem ser específicos de um único organismo ou comum para determinados grupos (Salgado & Campos, 2003). Nos vegetais, estes compostos podem estar associados à diferenciação celular, à regulação do crescimento, à mediação das interações entre plantas e outros organismos e, principalmente a proteção da planta contra pragas e patógenos (Dobson, 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Diversas características associadas a compostos naturais com potencial biotecnológico como a especificidade bioquímica, a alta diversidade e estabilidade química, tornam estas estruturas base para a descoberta de novos nematicidas e nematostáticos, diferenciando-os dos produtos sintéticos (De Waele & Elsen, 2007). Adicionalmente, de acordo com a literatura extratos provenientes de sementes de plantas contém compostos de diferentes classes químicas, como; alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides, aminoácidos, glicosídeos, entre outros, que podem estar relacionados com a atividade biocida desses extratos (Ferraz & Freitas, 2004). Esses compostos podem apresentar algumas vantagens sobre os defensivos sintéticos, tais como: oferecer compostos que as pragas ainda não podem inativar; são menos concentrados e, portanto menos tóxicos do que compostos sintéticos, além de sofrerem biodegradação em uma velocidade mais rápida, por serem derivados de recursos renováveis e possuir múltiplos modos de ação (Ferraz & Freitas, 2004).

As plantas possuem substâncias químicas que podem agir diretamente no controle de fitopatógenos, sendo consideradas biocidas naturais. Essas substâncias oriundas de matéria-prima vegetal são menos tóxicas, e tendem a ter atividade mais específica para um determinado grupo de organismos (Dixon, 2001). Na tentativa de minimizar efeitos toxicológicos destes componentes químicos, o preparo de derivados de produtos naturais provenientes de plantas, tem sido uma alternativa eficaz e segura (Moura & Schlichting, 2007). Além disso, a biodiversidade brasileira se mostra como uma fonte riquíssima desses produtos, onde muitas espécies de plantas de diferentes gêneros foram relatadas como detentoras de compostos nematotóxicos, fungicidas ou bactericidas ao longo dos últimos 20 anos (Oliveira *et al.*, 2011; Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Entretanto, ainda existem muitos tipos de planta que ainda não tiveram seus compostos testados, e que possuem potencial deletério sobre muitas espécies de nematoides (Haseeb & Butool, 1996).

3.8 Extratos vegetais

Extratos vegetais são preparações concentradas obtidas a partir de distintas partes das plantas como sementes, raiz, caule, folha, flor e fruto. Os extratos podem apresentar diversas consistências, serem preparados por processos envolvendo algum tipo de solvente orgânico ou extração aquosa, passando ou não por algum tratamento prévio, como; maceração, inativação enzimática, filtrações, infusão, etc (Marques, 2005; Menezes, 2005). Ainda, após todas estas etapas, os extratos geralmente são submetidos à avaliação em bioensaios conduzidos *in vitro* (Moura & Schlichting, 2007). Para tanto, os compostos de interesse devem ser separados de um meio complexo, podendo esses compostos serem oriundos de toda a planta, ou partes dela, conforme descrito anteriormente (Marques, 2005; Menezes, 2005).

Extratos de plantas antagonistas contêm compostos de diferentes classes químicas que podem apresentar efeitos nematostático e/ou nematicida (Ferraz & Freitas, 2004; Ferraz & Freitas, 2008; Rocha *et al.*, 2017). Na literatura, há diversos relatos da ação de extratos vegetais sobre nematoides em testes *in vitro*, sendo alguns componentes químicos relacionados à essa atividade, com destaque para os metabólitos como; alcaloides, terpenoides, terpenos, taninos e compostos fenólicos, havendo vários relatos da ação de compostos com ação nematicida, como por exemplo alcalóides pirrolizidínicos que apresenta ação sobre *M. hapla* (Thoden *et al.*, 2009).

Esses componentes biocidas ativos, geralmente são resultantes do metabolismo secundário de plantas, sendo produzidos naturalmente, onde a quantidade e a composição química desses compostos irá determinar a efetividade da ação sobre fitopatógenos (Pegard *et al.*, 2015). Desse modo, no atual cenário, extratos de plantas com altos teores de compostos com ação biocida já descrito, têm sido testados para o controle de nematoides, considerando-se os mecanismos de defesa inato das plantas (Pegard *et al.*, 2015). Apesar do grande número de plantas, extratos e compostos já descritos exibindo atividade inseticida, fungicida e nematicida, a quantidade de produtos à base desses ingredientes disponibilizados comercialmente é bastante limitado, possivelmente em razão das dificuldades para obtenção de registro, além dos elevados custos desse processo (Vasantharaj, 2008; Corrêa & Salgado, 2011).

3.9 Metabolismo vegetal

O metabolismo de plantas pode ser subdividido em metabolismo primário e secundário, sendo que o metabolismo primário é composto por metabólitos essenciais para a sobrevivência

das plantas, podendo estar associados a compostos como os carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Gardiano, 2006). Esses metabólitos considerados primários apresentam função metabólica essencial, estando associados ao crescimento, desenvolvimento, manutenção das células, reprodução e fotossíntese (Croteau *et al.*, 2000; Dixon, 2001; Nass, 2007; Corrêa, 2015). Os chamados metabólitos primários estão amplamente distribuídos dentre os vegetais, sendo também precursores para os chamados metabólitos secundários, que são considerados produtos finais do metabolismo vegetal (Corrêa & Salgado, 2011).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos de natureza química diversa, sintetizados pelas plantas, que não possuem uma função direta no metabolismo do vegetal, estando geralmente associados com atividade de fitoproteção, atração ou repelência de polinizadores, adaptação ambiental, sinalização e sobrevivência das plantas (Whittaker & Fenny, 1971; Swain, 1977; McLaren, 1986; Wink, 1988; Taiz & Zeiger, 1991; Croteau *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2004; Nass, 2007; Corrêa, 2015). Esses metabólitos, não possuem distribuição universal entre os vegetais, sendo alguns específicos para determinadas espécies (Gardiano, 2006). Além disso, pertencem a várias classes distintas de substâncias como; alcaloides, terpenos, ligninas, flavonoides, cumarinas, benzenoides, quinonas, xantonas, lactonas, esteroides, entre outras (Di Stassi, 1996). Segundo Kim e colaboradores (2003), a maioria dos biocidas botânicos são de compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, que atuam na própria defesa química contra agentes patogênicos.

Os compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal são de grande interesse econômico, e podem ser aplicados na indústria, como; drogas, saborizantes, fragrâncias, inseticidas ou corantes. Adicionalmente, são cruciais nos processos de descoberta de rotas de síntese, e conseqüente desenvolvimento de novos produtos com aplicação tanto na indústria farmacêutica, como na agricultura (Croteau *et al.*, 2000; Dixon, 2001; Silva *et al.*, 2010; Corrêa, 2015).

Existem na natureza mais de 50 mil metabólitos secundários já identificados somente em angiospermas, provenientes de diferentes vias de biossíntese. Os três principais grupos de metabólitos secundários são: os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Croteau *et al.*, 2000; Corrêa, 2015; Rezende *et al.*, 2016). Dentre os metabólitos secundários, com efeito nematotóxico, destacam-se os polietienos encontrados em *Tagetes* spp., isotiocianatos e glicosinolatos oriundos de *Brassica* spp., ácido asparagúsico, isolado de *Asparagus officinalis* L. (Takasugi *et al.*, 1975), α -terthienyl de *Tagetes* spp. (Gommers, 1981) e L-Dopa de *Mucuna aterrima* L. (Barbosa *et al.*, 1999), ácido transaconítico de sementes de

Canavalia ensiformis (L.) DC. (Rocha *et al.*, 2017) e outros compostos isolados de diferentes famílias botânicas (Chitwood, 2002; Thoden *et al.*, 2009).

A demanda por novos produtos agrícolas com baixo nível residual é crescente, onde princípios ativos derivados do metabolismo vegetal, especialmente de metabólitos secundários, podem inibir o desenvolvimento de organismos fitopatogênicos, sendo alguns extratos vegetais já utilizados com sucesso para o controle de algumas pragas (Silva *et al.*, 2007).

3.10 Família Solanaceae

A família Solanaceae A.L. Jussieu, está inserida na ordem Solanales, que surgiu no período Cretáceo, há cerca de 106 milhões de anos (Bremer *et al.*, 2004). Essa ordem é caracterizada por plantas angiospérmicas, dicotiledôneas, contendo 4080 espécies, distribuídas em 165 gêneros e 5 famílias; Convolvulaceae A. L. Jussieu, Hydroleaceae L., Montiniaceae (Engl.) Nak, Sphenocleaceae (Lindl.) Mart. ex DC., e Solanaceae (Lin *et al.*, 2005). As famílias Solanaceae e Convolvulaceae são consideradas irmãs, sendo as duas maiores famílias dessa ordem. Acredita-se que o ancestral comum das espécies de plantas dessas famílias teria existido há cerca de 70 milhões de anos atrás (Durbin *et al.*, 2000).

A família Solanaceae é considerada cosmopolita, sendo a América do Sul um dos principais centros de diversidade e endemismo (Silva, 2012; Pereira *et al.*, 2018). Essa família possui cerca de 3000 espécies descritas, que estão distribuídas em 106 gêneros, estando 31 presentes no Brasil, com cerca de 500 espécies nativas brasileiras, e 215 consideradas endêmicas do país (Soares *et al.*, 2008; Stehmann *et al.*, 2016; Silva, 2012; Pereira *et al.*, 2018). Dentro dessa família, encontram-se alguns gêneros importantes do ponto de vista econômico, como os gêneros *Solanum*, *Physalis* L. e *Capsicum* L., e para fins ornamentais, como os gêneros *Petunia* L., *Solandra* L. e *Cestrum* L. (Hawkes, 1999). O gênero *Solanum* é considerado o maior e mais complexo, contendo cerca de 1500 espécies, sendo algumas amplamente consumidas para alimentação, como; batata, berinjela, tomate, jiló, pimentão, pimenta, entre outras. Apenas no Brasil já foram identificadas mais de 350 espécies pertencentes apenas a esse gênero (Pereira *et al.*, 2018).

A família Solanaceae é bem caracterizada quimicamente e, análises fitoquímicas de diferentes espécies desta família, indicaram a presença expressiva de alcaloides e flavonoides, em especial no gênero *Solanum* (Silva *et al.*, 2003). Vale enfatizar que várias dessas espécies foram utilizadas para bioprodução de sesquiterpenos e uma grande variedade de alcaloides tais

como; tropânicos, quinolizidínicos, piridínicos, indólicos, quinolínicos, esteroidais, pirrolizidínicos, piperidínicos, isoquinolínicos e mistos (Dixon, 2001; Pereira *et al.*, 2018).

Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando frutos, folhas, flores, raízes e sementes de plantas pertencentes à família Solanaceae, para diversos fins, sendo muitas dessas espécies amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças de pele, fígado e baço (Pinto *et al.*, 2011). Estudos com plantas de gêneros desta família já identificaram resistência associada a insetos e nematoides (Hawkes, 1999; Checon, 2011). Alguns extratos vegetais dessas plantas foram obtidos e já tiveram sua atividade biológica determinada, como por exemplo, extratos metanólicos de *Solanum paniculatum* L. que apresentaram atividade para as larvas de *Artemia salina* (Silva *et al.*, 2007) e de *S. americanum* Mill., popularmente utilizado para o controle de nematoides (Mors *et al.*, 2000).

Extratos foliares de *Datura metel* L. e *D. stramonium* L. foram avaliadas quanto a ação antagonista contra vários nematoides (Qamar *et al.*, 1995), incluindo atividade nematicida acima de 90% sobre *M. incognita* de extrato foliar de *D. metel* (Cobb, 1893). Extrato etanólico de *Solanum subinerme* Jacq. foram avaliados quanto à atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884 (Gonçalves *et al.*, 2016). Extratos alcaloidicos de frutos verdes de *S. asperum* Rich. foram avaliados no controle de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, um tipo de molusco hospedeiro do parasita que causa esquistossomose em humanos (Silva *et al.*, 2008), o que resultou no isolamento dos alcaloides solanandaina, solasonina e solamargina.

Análises de extratos vegetais de plantas dessa família indicam a presença de alcaloides, glicosídeos, cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos, entre outros. Esses compostos são de interesse terapêutico, e farmacológico, pois apresentam um grande leque de atividades citotóxica, anticancerígena, anti-inflamatória e biocida (Gonçalves *et al.*, 2016).

Considerando os dados da literatura e o potencial biotecnológico presente nas plantas, a prospecção de extratos crus aquosos e seus respectivos compostos, assim como a elucidação do mecanismo de ação e a caracterização de compostos com toxicidade seletiva a nematoides, figuram como uma promissora alternativa no controle desses fitopatógenos, como uma nova ferramenta aos métodos convencionais utilizados atualmente. Diante deste cenário, a busca por alternativas de controle desses fitopatogenos com vistas à sustentabilidade agrícola bem como a saúde humana, se torna imprescindível.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Multiplicação de *Meloidogyne incognita* em planta de Tabaco

Sementes de *Nicotiana tabacum* (tabaco) foram semeadas em casa de vegetação, localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Em torno de 20 dias pós-semeadura, as plântulas de *N. tabacum* foram transferidas para sacos plásticos medindo 20 x 30 x 12 cm, contendo cerca de 3100 cm³ da mistura estéril de solo, substrato comercial Bioplant®, e areia, na proporção de 4:2:4. Com cerca de duas semanas do transplantio das mudas, foi realizada a inoculação com aproximadamente 2000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*. Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação por pelo menos 60 dias, para que pudessem então ser utilizadas para a obtenção de ovos de *M. incognita* (Figura 3). Durante a manutenção do inóculo, foi realizado controle químico fitossanitário contra mosca-branca, fungos, ácaros, cochonilhas, pulgões, tripes e broca do tomateiro, aplicando-se os seguintes produtos químicos de maneira intercalada: Triflumuron, Methomyl, Tiofanato-metílico, Abamectina, Óleo mineral, Tiametoxan, considerando as doses recomendadas pelo Ministério da Agricultura.



Figura 3 – Raíz de *Nicotiana tabacum* infectada por *Meloidogyne incognita*. Fonte: Paula Ferreira, 2019.

4.2 *Meloidogyne* spp.: Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, *M. enterolobii* e *M. javanica* a partir de plantas de tabaco e tomate infectadas

Os nematoides pertencentes à espécie *M. incognita* foram mantidos em casa de vegetação em plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco), e os das espécies *M. enterolobii* e *M. javanica* foram multiplicadas em plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate). A extração dos ovos dessas espécies de *Meloidogyne* foram realizadas de acordo com a técnica desenvolvida por Hussey & Barker (1973), modificada por Bonetti & Ferraz (1981) e a eclosão dos ovos obtida com a técnica do funil de Baermann (1917) modificado. Para tanto, após 3 meses da infestação das raízes de *N. tabacum* e de *S. lycopersicum* as raízes foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente, seccionadas com tesoura e trituradas em liquidificador por cerca de 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio (NaCl) a 1,0% de cloro ativo, para desorção da matriz gelatinosa, e consequente exposição dos ovos. Após este procedimento, o material triturado, contendo os ovos, foi transferido para peneiras com diferentes tamanhos de malhas 60, 100, 200 e 500 mesh de acordo com metodologia de Coolen & D'Herde (1973), modificado por Bonetti & Ferraz (1981). O material retido na peneira de 500 mesh, foi lavado com água corrente até a retirada total da solução de hipoclorito, sendo a suspensão recolhida com auxílio de uma pisseta contendo água destilada (dH₂O). Em seguida procedeu-se duas centrifugações, sendo a primeira por 5 minutos na velocidade de 3,500 rpm descartando-se o sobrenadante, e a segunda por um minuto na velocidade 2,000 rpm com solução de sacarose de 50% (Centrifuga para tubos Quimis, Q222T). Após a centrifugação, o sobrenadante foi despejado numa peneira de 500 mesh, e lavados em água corrente até a retirada total da solução de sacarose. Posteriormente, o material contido na peneira de 500 mesh foi coletado com água destilada (dH₂O), e transferido para uma câmara de eclosão, sendo os juvenis eclodidos nas primeiras 48 horas descartados, utilizando-se somente os que eclodiram nas 48 horas subsequentes. Depois desse período, uma alíquota contendo 1ml foi transferida com auxílio de micropipeta para uma câmara de Peters, e os J2 foram contabilizados com o auxílio de um microscópio óptico, sendo estimado então a quantidade total de juvenis presentes nas amostras. Após este procedimento, os J2 foram transferidos para microtubos na proporção aproximada de 100 juvenis por tubo, para a execução dos testes biológicos *in vitro*.

4.3 Manutenção dos acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae em casa de vegetação para preparo do extrato proveniente de raízes

Sementes de quatro acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae (11, 48, 52 e 78), cedidas pelo banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças – CNPH, foram semeadas em bandejas contendo substrato Bioplant®, e mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente durante aproximadamente 30 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos de 23 x 30 x 12 cm, contendo cerca de 3100 cm³ da mistura estéril de solo, substrato comercial Bioplant® e areia na proporção de 4:2:4, sendo as plantas regadas duas vezes ao dia com água de torneira.

4.4 Obtenção dos extratos cru aquosos (ECA's) de raízes dos acessos da espécie de Solanácea estudada

As plantas cultivadas em casa de vegetação, cresceram por cerca de 11 meses para o total desenvolvimento do sistema radicular. As raízes foram então separadas da parte aérea, lavadas em água corrente até a completa retirada de qualquer resíduo de solo e/ou substrato, e posteriormente secas com o auxílio de papel toalha (Figura 4). Após esse procedimento, as raízes foram seccionadas com tesoura e maceradas em cadinho com adição de nitrogênio líquido para a obtenção do pó resultante.

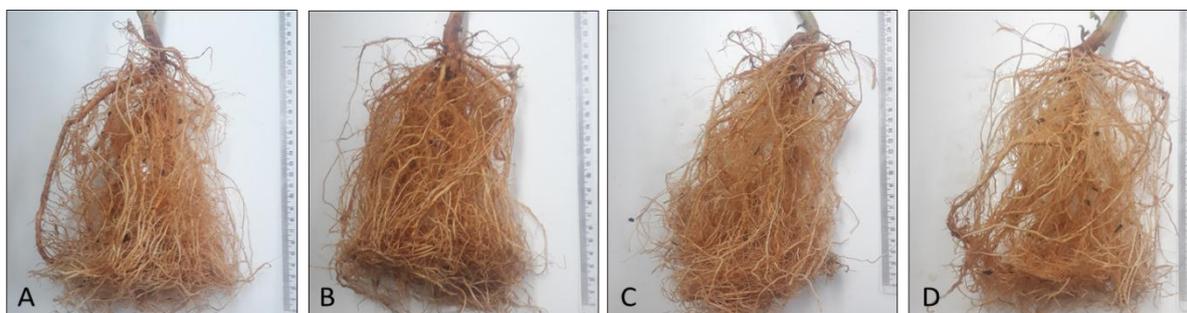


Figura 4 – Raízes dos acessos provenientes de uma espécie de Solanaceae, utilizadas para a obtenção dos ECAs. (A) Acesso 11; (B) Acesso 48; (C) Acesso 52; (D) Acesso 78. Fonte: Paula Ferreira, 2019.

Após a maceração, o material triturado foi pesado, homogeneizado com água destilada mantendo uma proporção de: 1g do pó resultante da raiz em 6ml⁻¹ de dH₂O, e mantido sob leve agitação durante 24 horas em câmara fria a 4 °C. Após esse período, os materiais foram submetidos a duas filtrações de acordo com a metodologia adaptada de Ferris & Zheng (1999) e Rocha *et al.*, (2017), sendo a primeira em gaze, e a segunda em papel filtro do tipo Melita utilizando bomba a vácuo, kitassato, funil de filtração. Os materiais filtrados foram congelados

em nitrogênio líquido, para serem posteriormente liofilizados até a completa remoção de água das amostras.

4.5 Obtenção dos extratos crus aquosos (ECA's) de sementes dos acessos da solanácea estudada

As sementes dos acessos; 11, 48, 52 e 78 de uma espécie de solanácea foram fornecidas pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Hortaliças - CNPH. Os materiais foram desinfetados em solução de hipoclorito de sódio 0,1% (VV) durante 5 minutos, e secos em papel toalha. Em seguida, as sementes de cada acesso foram pesadas e moídas individualmente num triturador elétrico Turrax. O material triturado foi homogeneizado com água destilada mantendo uma proporção de 1g em 6ml⁻¹ de dH₂O em tubos para centrifugação tipo Falcon de 50 ml, os quais subsequentemente foram mantidos sobre leve agitação durante 24 horas em câmara fria a 4 °C. Após esse procedimento, as amostras foram filtradas em gaze e centrifugadas a 10.000 rpm durante 45 minutos a 4 °C (Centrífuga de bancada refrigerada Eppendorf 5804R). Os *pellets* foram descartados e os sobrenadantes (extratos crus aquosos) foram coletados, filtrados em membrana de 0,45 µm, liofilizados e posteriormente utilizados nos testes biológicos.

4.6 Liofilização dos extratos

Os materiais biológicos, ECA's de raízes, ECA's de sementes, e frações cromatográficas, foram liofilizados em Liofilizador Savant-Super Modulyo (Thermo-Fischer, Waltham, MA, EUA) para a retirada total da umidade presente na amostra. Após esse procedimento, o material liofilizado foi estocado a -80 °C para posterior utilização nos ensaios biológicos.

4.7 Ensaios biológicos:

4.7.1 Bioensaio *in vitro* de viabilidade de juvenis de *Meloidogyne spp*, para certificação da atividade nematostática dos ECAs dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae

Bioensaio *in vitro* de viabilidade foram realizados para certificação da atividade nematotóxica dos ECAs provenientes das raízes e das sementes dos acessos 11, 48, 52 e 78 de Solanaceae. Todos os bioensaios foram realizados em triplicata, com repetição no tempo.

Uma alíquota de 20 µl dos ECA's de raízes e sementes (1000 µg/ 20 µl), e 25 µl das frações cromatográficas (250 µg/ 25 µl), foram transferidas individualmente para tubos de microcentrífuga contendo cerca de 100 J2 das respectivas espécies de *Meloidogyne* spp. em 500 µl de volume final. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente, e os nematoides contados em câmara de Peter com o auxílio de microscópio óptico, após 48 horas de exposição aos ECAs. Os bioensaios foram realizados em triplicata, e foram utilizados como controles positivo e negativo álcool 70% e dH₂O, respectivamente. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA Two-way com pós-teste Tukey.

4.7.2 Bioensaio *in vitro* de recuperação de juvenis de *Meloidogyne* spp, para certificar atividade nematotóxica: (nematostática e/ou nematicida)

A mortalidade dos J2 das respectivas espécies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*) foi certificada por meio de bioensaio de recuperação. Neste procedimento os nematoides paralisados após 48 horas de exposição aos ECAs, foram centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos (Centrífuga refrigerada de bancada - Eppendorf 5804R). O sobrenadante foi descartado, e os nematoides suspensos cuidadosamente em 1ml de água destilada, para efetuar a remoção total dos ECAs utilizado no tratamento. A lavagem foi repetida três vezes, e após a última lavagem os nematoides permaneceram em água destilada por mais 24 horas. Subsequentemente, os nematoides foram avaliados por microscopia óptica, sendo contabilizados para a determinação da atividade nematicida e/ou nematostática. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA Two-way com pós-teste Tukey.

4.7.3 Curva de concentração para avaliação da menor concentração nematotóxica e DL₅₀ dos ECAs sobre juvenis de *Meloidogyne incognita*

Os ECA's que apresentaram atividade nematicida superior a 80% sobre J2 de *M. incognita* foram selecionados para a confecção da curva de concentração e o estabelecimento da Dose inibitória letal (DL₅₀) para esta espécie. Nesse sentido, bioensaios contendo diferentes concentrações; 100, 250, 500 e 1000 mg.ml⁻¹ foram realizados para cada um dos ECA's dos acessos ativos (48, 52 e 78). Para cada bioensaio com as diferentes concentrações dos ECAs, foram transferidos em média 100 J2 de *M. incognita* para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo um volume final de 500 µl cada. Esses tubos de microcentrífuga foram mantidos a temperatura ambiente, e após 48 horas os J2 paralisados foram contabilizados com o auxílio de

microscópio óptico. Os bioensaios foram conduzidos em triplicata, com repetição no tempo, tendo dH₂O como controle negativo e álcool 70% como controle positivo. A mortalidade dos J2 foi certificada utilizando o ensaio de recuperação descrito no item 3.7.2, e os dados gerados foram avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA Two-way com pós-teste Tukey.

4.7.4 Testes de termoestabilidade:

Os ECA'S exibindo atividade nematotóxica foram avaliados quanto à estabilidade térmica contra J2 de *M. incognita*. Nesse sentido, alíquotas de 20 µL contendo 1 mg dos ECAs nematotóxicos foram incubadas em banho maria por um período de 24 horas a temperatura de 50 °C. Após este procedimento, os ECAs foram avaliados em bioensaio *in vitro* de viabilidade e recuperação descritos nos itens 3.7.1 e 3.7.2. Alíquotas de 20 µl contendo 1 mg dos respectivos ECA's obtidos no processo térmico, foram utilizados para a realização dos ensaios biológicos *in vitro* de viabilidade e recuperação utilizando J2 de *M. incognita*, para verificar se as propriedades nematotóxicas identificadas previamente nesses ECA's seriam mantidas mesmo após o aquecimento por um período prolongado. Os bioensaios foram realizados em triplicata, com repetição no tempo, tendo em média 100 J2 de *M. incognita* por tubo de microcentrífuga de 1 ml, sendo dH₂O e etanol 70% utilizados como os controles negativo e positivo respectivamente. Neste bioensaio os ECAs sem o tratamento térmico também foram utilizados como controles internos. Os dados gerados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

4.7.5 Avaliação da reação dos acessos de Solanaceae utilizados para obtenção dos ECAs

Sementes dos acessos 11, 48, 52 e 78 e *Nicotiniana tabacum* (usada como controle) foram semeadas em bandejas contendo substrato Bioplant®, e mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 30 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos de 20 x 30 x 12 cm, contendo cerca de 3100 cm³ da mistura estéril de solo, substrato comercial Bioplant® e areia na proporção de 4:2:4. Após 15 dias do transplântio, as plântulas foram inoculadas com cerca de 3200 J2 de *M. incognita*, e permaneceram por cerca de 90 dias e casa de vegetação.

Essas plantas foram arrancadas, suas raízes foram lavadas em água corrente, completamente limpas foram fotografadas, medidas e pesadas. Sequencialmente, as raízes foram

coradas com β -phloxin (Sigma-Aldrich, 0,015 mg/l) por 5 minutos, e com o auxílio de um microscópio estereoscópio, determinou-se o número total de massas de ovos, e o número total de galhas de cada raiz. Após esse procedimento, foi então realizada a extração de nematoides pelas metodologias propostas por Jenkins (1964) para determinação de J_2 presentes no solo e de Coolen & D' Herde (1972) no caso de ovos/ J_2 presentes nas raízes, e determinou-se o fator de reprodução após contagem em microscópio óptico. Esse ensaio foi realizado em quintuplicata, com repetição no tempo, e as plantas utilizadas na análise foram clonadas por estaquias e estão acondicionadas em casa de vegetação.

4.7.6 Avaliação de toxicidade dos ECA's ativos sobre hemácias

Amostras de sangue bovino foram coletadas por meio venoso em agente anticoagulante (Heparina) de animal mantido na Fazenda Sucupira da Embrapa, para a avaliação do efeito hemolítico dos ECA's nematotóxicos. O sangue coletado foi lavado em solução fisiológica por três vezes, e então centrifugado a 2.600 rpm por 5 minutos para separação das hemácias do soro. Nesse bioensaio, os ECA's ativos foram testados sobre as hemácias bovinas, sem a presença de soro, sendo esses extratos previamente filtrados em fluxo laminar com filtros de 0,22 μm , e solubilizado em tampão fosfato salino (PBS 1X pH 7,4), para a confecção das curvas de calibração referente aos testes de toxicidade. Em placas de Elisa, foram adicionados 100 μl do concentrado de hemácias em cada poço, e 100 μl da amostra dos respectivos ECA's contendo 1 mg do material ativo (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2004). As amostras foram incubadas a 37 °C, durante 30 minutos sob agitação lenta. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se os controles: a) controle positivo H_2O (100% de hemólise); b) controle negativo PBS. A leitura espectrofotométrica do sobrenadante foi realizada a 567 nm, utilizando-se o leitor de microplacas Benchmark PlusTM.

4.7.7 Avaliação de toxicidade dos ECA's ativos em juvenis de *Meloidogyne incognita* sobre células do ovário de *Spodoptera frugiperda*

Esse bioensaio avalia a atividade metabólica das células de insetos, quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, que resultam na formação de cristais de formazan de coloração azul no interior das células. Esses cristais de formazan podem ser solubilizados e quantificados por métodos espectrofotométricos.

Para esse bioensaio foram utilizadas células de ovário de *Spodoptera frugiperda*, cedidas pelo Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, sendo essas células repicadas 48 horas antes da realização do ensaio. Após 48 horas da repicagem das células, foi retirado todo o meio de cultura de cada poço (100 µl), adicionados 100 µl de meio de cultura contendo MTT (Life, USA) 0,5 mg/ml em meio de cultura (10 µl de MTT e 90 µl de meio de cultura), e 20 µl da amostra do ECA ativo contendo 1 mg. Posteriormente a placa foi incubada em estufa pelo período de 2 horas a 37 °C e 5% de CO₂, sendo o material retirado e adicionado 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma, EUA) em cada poço da placa para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância dos poços foi avaliada por espectrofotômetro utilizando-se o leitor de microplacas Benchmark PlusTM a 595 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do controle negativo (água ultrapura) como 100% de viabilidade.

4.7.8 Avaliação de toxicidade dos ECA's oriundos de sementes em queratinócitos humanos (HaCat)

A linhagem de queratinócitos de pele humana (HaCat) da American Type Culture Collection (ATCC) foi proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. O bioensaio foi conduzido no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade de Brasília. As células foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm² contendo 10 ml de meio de cultura completo: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (Life, EUA) e 1% de antibiótico (Penicilina – Streptomicina, Life, EUA) (v/v), e mantidas em estufa umidificada (Thermo Scientific, EUA) a 37 °C e 5% de CO₂.

4.7.9 Tripsinização dos queratinócitos humanos (HaCat)

A linhagem celular de queratinócitos utilizada (HaCat) são aderentes, dessa forma, a tripsina, que é uma enzima que hidrolisa ligações peptídicas, foi utilizada para soltar as células da superfície do frasco de cultura. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi descartado, e 3 ml de tripsina (tripsina 0,25%, Life, EUA) foram adicionados. As células foram incubadas por 3 minutos na estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após a observação por microscopia de luz que as células estavam soltas, 3 ml de meio de cultura completo foram adicionados para neutralizar o efeito da tripsina. O conteúdo do frasco foi transferido para um tubo tipo Falcon de

15 ml. Efetuou-se a centrifugação do material por 3 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura e utilizado nos passos descritos nas etapas seguintes.

4.7.10 Plaqueamento das células de queratinócitos humanos (HaCat)

Dez microlitros (10 µl) das células de queratinócitos humanos (HaCat) ressuspensionadas em 1 ml de meio de cultura foram separados em um microtubo de 0,6 ml e 50 µl de azul de tripan foram adicionados. Após homogeneização, 10 µl foram colocados em uma câmara de Neubauer e as células foram contadas em microscópio de luz invertido. O número de células foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo: n° de células/ml = n° de células contadas / n° de quadrantes contados x fator de diluição x 10000. Foram adicionadas 3000 células/poço em placa de 96 poços de fundo achatado. Após o plaqueamento, as placas contendo as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

4.7.11 Tratamentos dos queratinócitos humanos com os ECAs das sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78)

Os ECAs e o controle foram previamente preparados em microtubos de polipropileno de 2 ml e diluídos em meio de cultura completo para obter as concentrações de 125, 250, 500, e 1000 µg.ml. A amostra de controle negativo foi preparada com água ultrapura em meio de cultura completo, adicionando-se volumes equivalentes aos volumes acrescentados para os grupos experimentais. Para a aplicação do tratamento nas células, o meio de cultura de cada poço foi descartado na medida em que foram adicionados 200 µl das diferentes amostras citadas acima (125, 250, 500, e 1000 µg.ml). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 e 48 horas.

4.7.12 Teste de viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) – Ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol)

Após 24 e 48 horas de exposição dos queratinócitos (HaCat) às diferentes concentrações das amostras, o bioensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT foi realizado. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução do MTT (amarelo) pela ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH em cristais de formazan (azul). O meio de cultura contendo as diferentes amostras foi retirado da placa e 150 µl de solução de MTT (0,5

mg/ml em meio de cultura completo - 15 µl de MTT (Life, EUA) com 135 µl de meio de cultura) foram adicionados a cada poço. Após 2 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, a solução de MTT foi descartada e 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EUA) foram acrescentados em cada poço da placa para dissolver os cristais de formazan formados. O ensaio foi realizado em triplicata, e a absorbância dos poços foi avaliada por espectrofotômetro (Molecular devices, EUA) a 595 nm. Os resultados foram apresentados em percentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do controle negativo (água ultrapura) como 100% de viabilidade.

4.7.13 Avaliação da fitotoxicidade dos ECAs de sementes de acessos de uma espécie de solanácea em sementes de soja

Para avaliação da ação fitotóxica, cinco sementes de soja (*Glycine max*, BRS 7980) foram tratadas com uma solução contendo 1 mg.ml⁻¹ dos ECAs provenientes de sementes de quatro acessos (11,48,52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae. As sementes foram desinfestadas em solução de etanol 70%, cloro ativo 1% e água destilada por dois minutos cada solução. Posteriormente as sementes foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 40 ml de meio MS (Murashigie & Skoog, 1962) cada. Após o resfriamento do meio, 20 µl contendo 1 mg do ECA foi adicionado em cada tubo que permaneceu por 15 dias para a avaliação da germinação e do enraizamento de cada plântula. Nesse processo, os tubos com sementes de soja foram mantidos em sala de cultura de tecidos com temperatura oscilando entre 26 °C ±2 com fotoperíodo de 16 horas de luz. Das plântulas germinadas, foram avaliados o peso fresco total, peso fresco da raiz, peso fresco da haste, comprimento do colo ao ápice, peso seco da raiz e peso seco total. Como controle negativo, foram utilizadas sementes de soja adicionadas ao meio MS.

4.8 Bioensaio de especificidade dos ECAs contra organismos não-alvo

Bioensaios foram realizados para aferir a toxicidade dos ECA's ativos contra juvenis de *M. incognita* para outros grupos de organismos não-alvos. Nesse sentido, os ECAs foram avaliados contra bactéria, fungos e leveduras benéficos do solo, em experimentos conduzidos *in vitro*, que estão descritos nos itens 3.8.1, 3.8.2 e 3.8.3.

4.8.1 Avaliação da ação dos ECA's ativos utilizando estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079)

Os ECAs exibindo atividade nematicida foram avaliados sobre bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam células dentro dos nódulos radiculares de plantas da família Fabaceae. Para esse ensaio estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (Kirchner) Jordan, foram isoladas da cultura da soja, sendo um dos inoculantes comerciais mais utilizados para essa cultura. Os bioensaios foram conduzidos em triplicata, sendo utilizado meio TY (Tryptone Yeast) para as espécies de *Bradyrhizobium*. Os inóculos foram preparados a partir de cultura em meio líquido, onde permaneceram crescendo em agitador a 28 °C, 150 rpm por 48 horas. Após o crescimento em meio líquido, foi medido o índice de oxigênio dissolvido (OD - 2.01), e utilizados 60 µl da suspensão bacteriana em cada placa de Petri contendo cerca de 20 µl de meio TY – sólido, e espalhadas uniformemente sobre a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski. A técnica de difusão em disco foi realizada utilizando o método padrão recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS) com modificações, onde quatro discos foram distribuídos nas extremidades das placas, sobre a superfície do ágar, sendo 20 µl dos ECA's ativos contendo 1 mg, dispensados sobre o centro de cada disco. O controle negativo usado no teste foi dH₂O. Posteriormente essas placas foram mantidas em estufas tipo B.O.D com temperatura de 28 °C sobre leve agitação a 150 rpm por 48 horas. A avaliação foi realizada mediante a presença ou ausência de halo ao redor dos disco de papel onde os ECA's foram adicionados.

4.8.2 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre *Trichoderma* (*T. asperellum* - CEN 162 e *T. harzianum* - CEN 267)

Os ECAs provenientes de sementes de acessos de Solanaceae foram também avaliados quanto ao crescimento micelial de duas espécies do gênero *Trichoderma* spp; *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, Sydowia – CEN 162 e *Trichoderma harzianum* Rifai – CEN 287 (Família Hipocreaceae) cedidos pelo laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN. As espécies foram identificadas molecularmente com a utilização das regiões ITS-I e ITS-II, sendo preservados sob a nomenclatura CEN 162 e CEN 267 (*T. harzianum* e *T. asperellum*), ambos isolados de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.).

O bioensaio foi conduzido em triplicata, onde 10 mg de cada ECA foram adicionados individualmente em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 25ml de meio batata-

dextrose-água (BDA) em cada placa. Os ECAs foram solubilizados junto ao meio, com o auxílio de alça de Drigalski utilizando movimentos circulares. Após o resfriamento, discos de micélios de cada espécie de *Trichoderma* Pers. medindo 7 mm, foram adicionados ao centro das placas, onde permaneceram em câmara de incubação com fotoperíodo de 16 horas a 25 °C \pm 2 durante três dias. A análise do crescimento micelial foi realizada de maneira qualitativa para aqueles ECAs que não demonstraram nenhum efeito sobre o crescimento dos micélios, sendo comparado à taxa de crescimento à visualizada nos controles (sem a presença de extrato).

4.8.3 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre *Candida maltosa* (CA 49)

Os ECA's ativos também foram testados sobre a levedura de solo *Candida maltosa* CA 49 Komag. Nakase & Katsuya, oriunda de área de gramínea revegetada no estado de Minas Gerais, município de Brumadinho. O bioensaio foi realizado em triplicata, todos repetidos no tempo utilizando meio Yeast Extract - Peptone - Dextrose (YPD). A técnica de difusão em disco foi realizada segundo o método padrão recomendado pelo NCCLS com modificações, onde os discos foram distribuídos nas extremidades das placas, na superfície do ágar, sendo 20 μ l dos ECA's ativos contendo 1 mg, dispensados sobre o centro de cada disco. O controle negativo foi dH₂O, As placas permaneceram por um período de 48 horas em estufa tipo B.O.D com temperatura de 28 °C sob leve agitação a 150 rpm. A avaliação foi feita mediante a presença ou ausência de halo ao redor dos disco de papel onde os ECA's foram adicionados.

4.9 Métodos Cromatográficos:

4.9.1 Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) - Coluna de exclusão molecular

A cromatografia é uma técnica analítica baseada na separação de moléculas por diferenças na sua estrutura e/ou composição, sendo a cromatografia por exclusão molecular, uma purificação que permite separar componentes das amostras que possuam massa molecular diferentes, baseando-se no princípio do peneiramento. Como resultado desse processo, os solutos são separados com base nos seus tamanhos, funcionando a fase móvel como uma peneira molecular, seguindo o princípio de BOCOF (os maiores saem primeiro). Para essa separação foram realizadas corridas de 80 minutos, onde foi injetada amostra do ECA de maior destaque: S48 (1mg a cada 20 μ l) já filtrado em filtro (Millipore) de 0.22 μ m, sendo solubilizado 200 μ l do ECA ativo em 500 μ l de volume final de H₂O (Milli – Q). O cromatógrafo utilizado foi formado

por duas bombas modelo LC6AD, detector UV-VIS SPD-20A, injetor manual do tipo Rheodyne, acoplados a um controlador de operações modelo CBM20A (Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna empregada foi a GE Healthcare SuperdexTM 200 (10/300 GL).

O ECA ativo (S48) foi eluído com fluxo de 0,35 ml por minuto, com 30% de acetonitrila isocrática em água. A eluição do ECA ativo S48 foi monitorada nos comprimentos de ondas de 216, 254 e 280 nm, sendo as frações coletadas manualmente, rotavaporizadas em speed vac por 24 horas, e posteriormente testadas individualmente sobre J2 de *M. incognita* em bioensaio *in vitro* conforme metodologia descrita nos itens 3.7.1 e 3.7.2.

4.9.2 Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Performance de Adsorção por Fase Reversa (RP-HPLC)

Após a realização dos bioensaios *in vitro* com as frações resultantes da Cromatografia por exclusão molecular descrita no item 3.10.1, a fração nematocida ativa foi selecionada e fracionada via Cromatografia Líquida de Alta Performance por adsorção com fase reversa (RP-HPLC). A fração Fr-6 (550 µg solubilizado em 500 µl de H₂O Milli-Q) foi injetada em coluna Jupiter 5µ, C18, 300A, C18 (10 mm x 250 mm) O 20, em cromatógrafo formado por duas bombas modelo LC6AD, detector UV-VIS SPD-20A, injetor manual do tipo Rheodyne, acoplados a um controlador de operações modelo CBM20A (Shimadzu, Kyoto, Japão). O material foi eluído com fluxo de 0.35 ml por minuto obedecendo a um gradiente de 5 a 80% de acetonitrila e água e TFA 0,1% (999 ml de H₂O Milli - Q + 1ml de TFA) em volume, resultando em 17 frações com diferentes tempos de retenção da Fr-6. A eluição foi monitorada nos comprimentos de ondas de 216, 254 e 280 nm, sendo as frações coletadas manualmente, rotavaporizadas em speed vac por 24 horas, e armazenadas a - 20 °C, para posterior utilização.

4.10 Identificação das massas de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e análise por tempo de voo (MALDI/TOF) dos componentes das frações de S48 e Fr6.

Uma alíquota de 1µl dos ECAs selecionados nos processos descritos nos itens 3.10.1 e 3.10.2 (S48 e Fr-6) foram diluídos em 4µl de matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ mL), e após a secagem em placa AnchorChip var/96 MALDI (Bruker Daltonics, Alemanha), as amostras cristalizadas foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonics) em modo refletido/positivo na faixa de m/z 100-1000 no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN. Os

íons típicos da matriz foram utilizados para realizar a calibração externa. A aquisição dos espectros ocorreu automaticamente utilizando-se procedimento padrão com acumulação de 1000 disparos de laser a 60 HZ.

5.RESULTADOS

5.1 Bioensaio *in vitro* de viabilidade e recuperação de juvenis de *Meloidogyne incognita* para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos das raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae

Os ECAs obtidos a partir de raízes (R) dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, foram submetidos a ensaio biológico de viabilidade *in vitro* contendo em média 100 ± 5 J₂ de *M. incognita*. Os resultados do bioensaio demonstraram a paralisação acima de 90% dos J₂ para todos os ECA's de raízes avaliados na concentração de 1mg.ml^{-1} em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, após 48 horas de exposição (Figura 5).

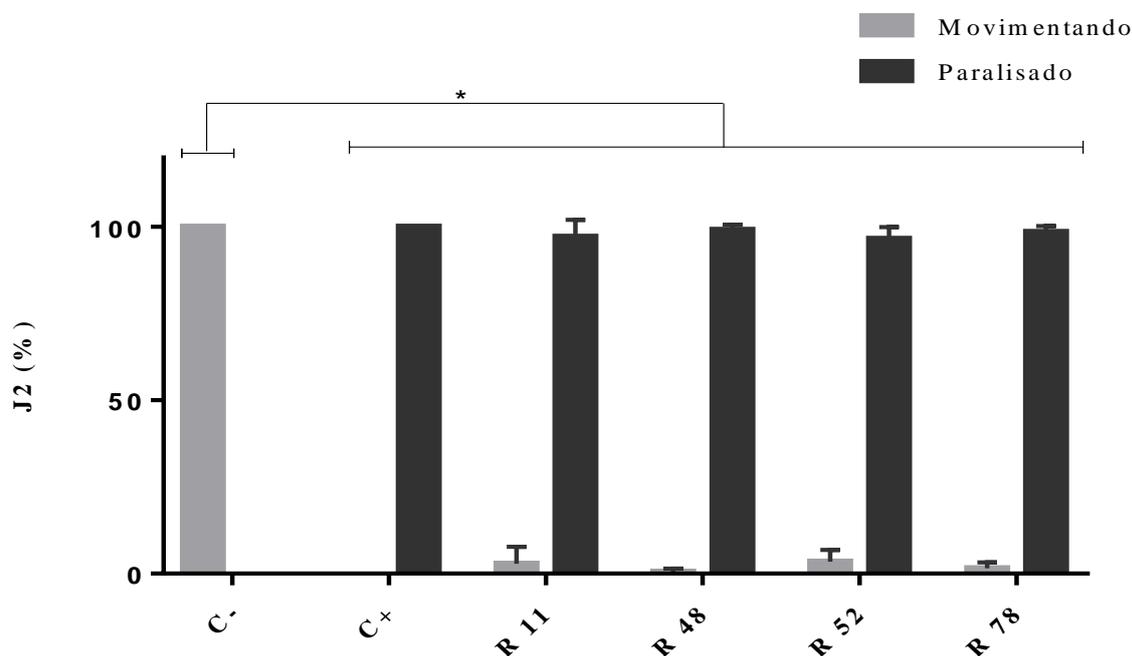


Figura 5. Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. Controle negativo (C⁻) dH₂O; e Controle positivo (C⁺) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

Os ECAs provenientes das raízes desses acessos tiveram sua ação nematotóxica (nematicida e/ou nematostática) determinada por meio de bioensaio de recuperação *in vitro*. O ECA da raiz 48 (R48) apresentou a maior atividade nematicida sobre os J2 de *M. incognita*, com cerca de 65% dos nematoides mortos, após bioensaio de recuperação. Os demais ECAs radiculares (R11, R52 e R78) não apresentaram nenhuma ação biocida sobre os J2 de *M. incognita*, sendo constatada somente uma atividade nematostática, com mais de 90% dos J2 tendo recobrado a motilidade para todos os tratamentos (Figura 6).

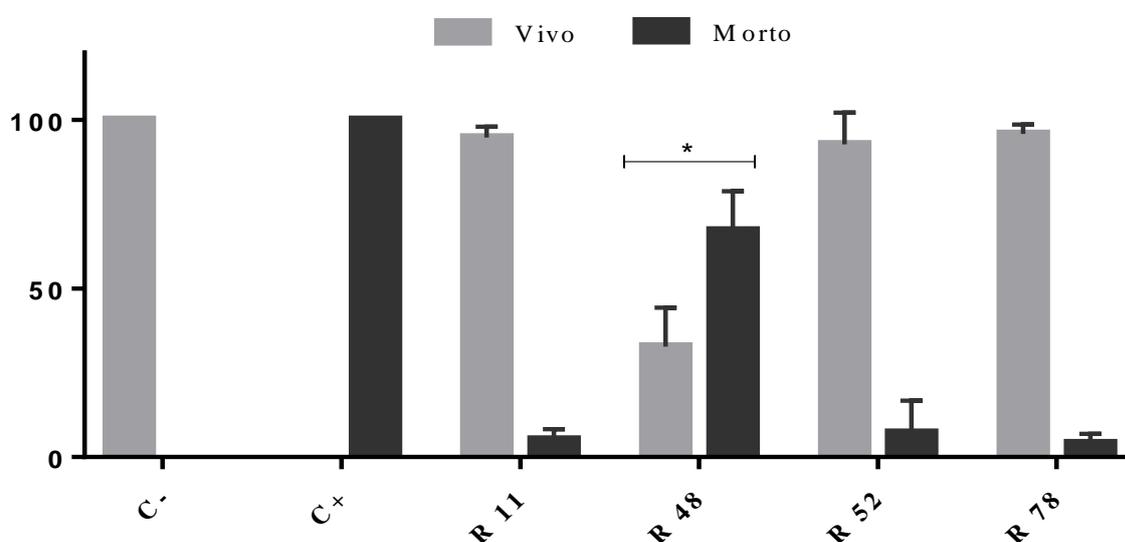


Figura 6 – Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do ensaio de viabilidade *in vitro*. Bioensaio realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

5.2 Bioensaio *in vitro* de viabilidade e recuperação de juvenis de *Meloidogyne incognita* para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae.

Os ECAs obtidos a partir de sementes (S) dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, foram submetidos a ensaio biológico de viabilidade *in vitro* contendo em média 100 ± 5 J2 de *M. incognita*. Os resultados do bioensaio demonstraram a

paralisação de 100% dos J2 de *M. incognita* para todos os ECA's de sementes na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, após 48 horas de exposição (Figura 7).

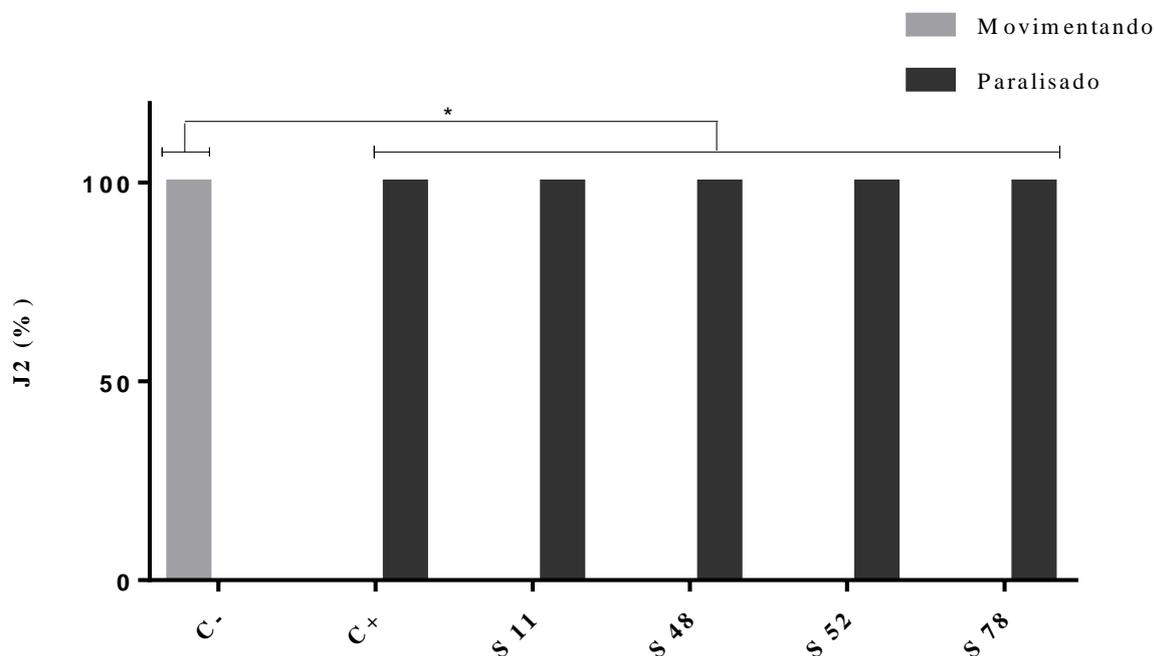


Figura 7 – Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$

Os ECAs provenientes das sementes desses acessos tiveram sua ação nematotóxica (nematicida e/ou nematostática) determinada utilizando o bioensaio de recuperação *in vitro*. Os ECAs das sementes 48 (S48), 52 (S52) e 78 (S78) apresentaram alto potencial nematicida com atividade acima de 90% sobre J2 de *M. incognita* respectivamente, sendo o ECA S48 o de maior destaque com 100% dos J2 mortos, após a recuperação dos nematoides previamente tratados no bioensaio de viabilidade. Já para o ECA da semente 11 (S11) foi constatada apenas uma ação nematostática, com cerca de 72% dos J2 recobrando a motilidade, após o bioensaio de recuperação (Figura 8).

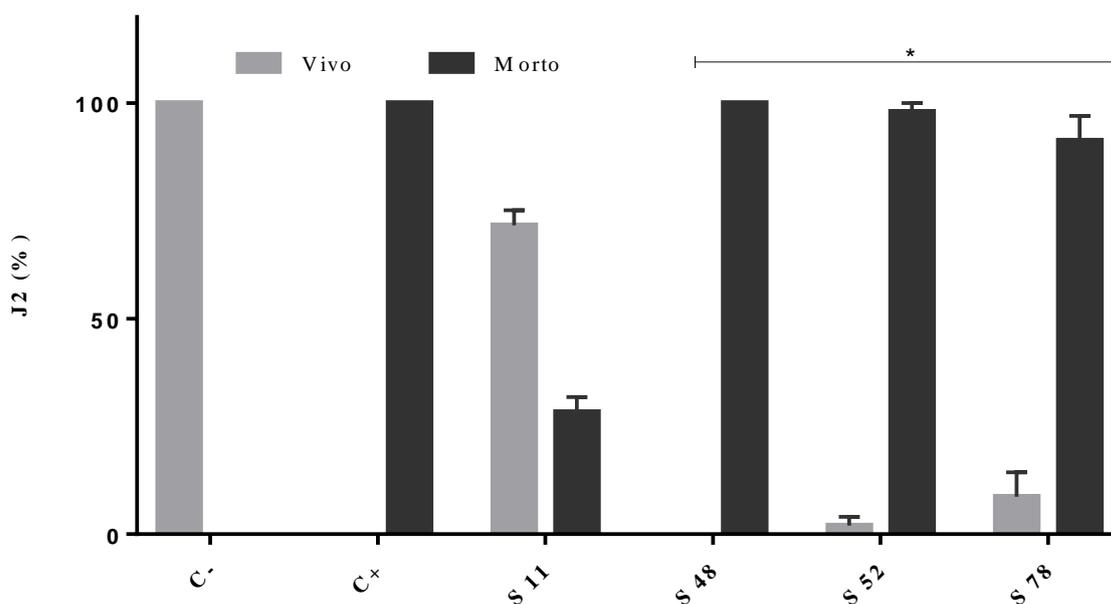


Figura 8 – Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do ensaio de viabilidade *in vitro*. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

5.3 Bioensaio *in vitro* de viabilidade e recuperação de juvenis de *Meloidogyne javanica* para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos de raízes e sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae.

Os ECAs obtidos a partir de raízes (R) e sementes (S) de quatro acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, foram submetidos ao bioensaio *in vitro* de viabilidade contendo em média 100 ± 5 J₂ de *M. javanica*. Os resultados do bioensaio demonstraram a paralisação de 100% dos J₂ para todos os ECAs de raízes e sementes avaliados na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, após 48 horas de exposição (Figura 9).

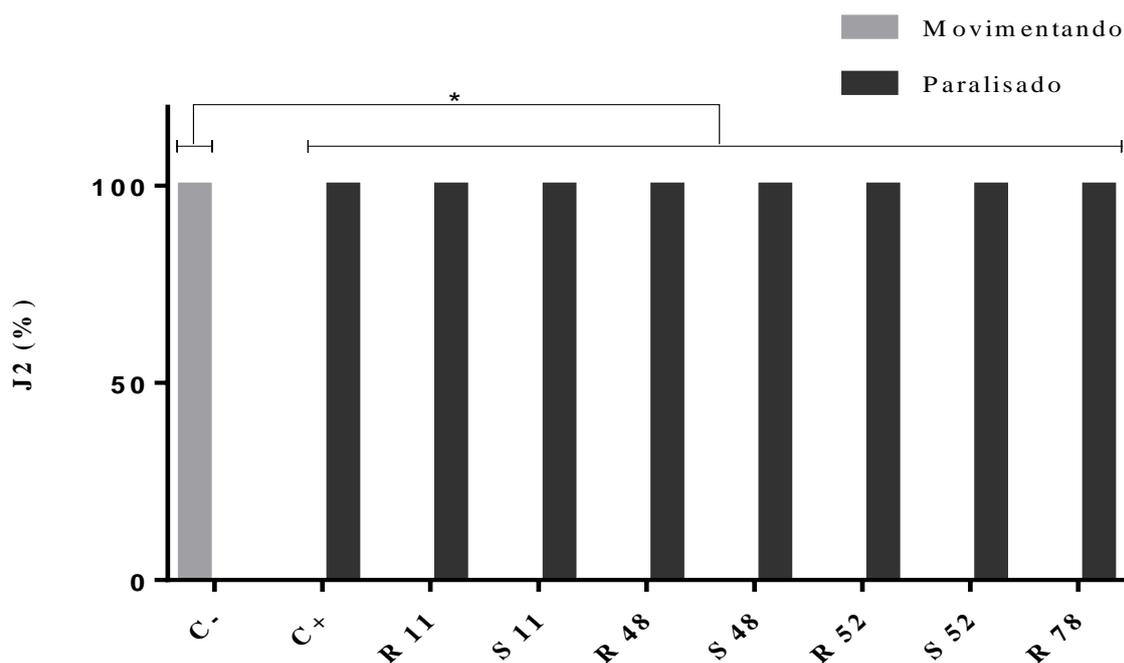


Figura 9 – Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes e raízes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

Os ECAs provenientes das sementes e raízes desses acessos tiveram sua ação nematotóxica (nematicida e/ou nematostática) determinada por bioensaio de recuperação *in vitro*. Constatou-se que todos os ECAs provenientes de sementes (S11, S48, S52 e S78) tiveram ação nematicida sobre os J2 de *M. javanica*, com atividade acima de 97%, com 24 horas pós-recuperação dos J2 tratados no bioensaio *in vitro* de viabilidade. Os demais ECAs radiculares (R11, R48, R52 e R78) não apresentaram nenhuma ação biocida considerável, tendo a R48 demonstrado a maior atividade nematicida dentre os ECAs radiculares, com apenas 17% dos J2 de *M. javanica* mortos, após o bioensaio de recuperação, sendo constatada somente uma atividade nematostática para esses extratos radiculares, com a maior parte dos J2 recobrando a motilidade para todos os tratamentos (Figura 10).

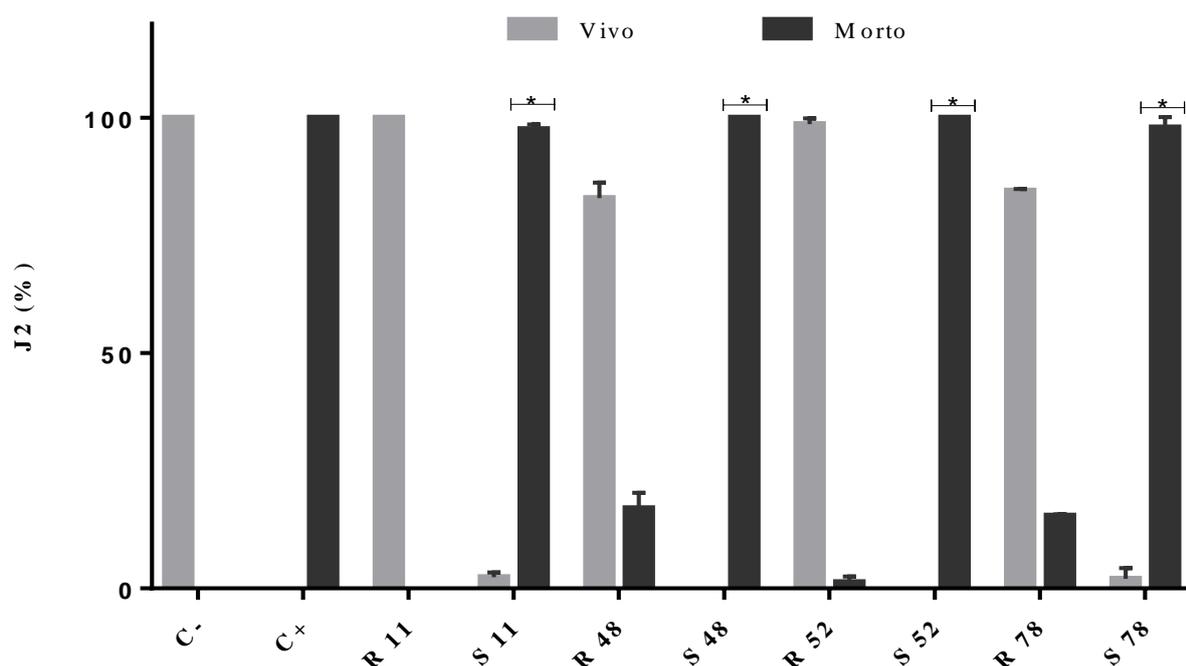


Figura 10 – Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de raízes e sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de 1mg.ml^{-1} em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e Controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

5.4 Bioensaio *in vitro* de viabilidade e recuperação de juvenis de *Meloidogyne enterolobii* para certificação da atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs oriundos de sementes dos acessos (48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae

Os ECAs que apresentaram melhor atividade nematicida sobre J2 de *M. incognita* e *M. javanica*, foram selecionados e tiveram sua atividade testada sobre a fase infectante de *M. enterolobii*. Os ECAs obtidos de sementes (S) dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, foram submetidos a bioensaio *in vitro* de viabilidade contendo em média 100 ± 5 J2 de *M. ienterolobii*. Os resultados do bioensaio demonstraram a paralisação de 100% dos J2 para todos os ECA's de sementes na concentração de 1mg.ml^{-1} em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, após 48 horas de exposição (Figura 11).

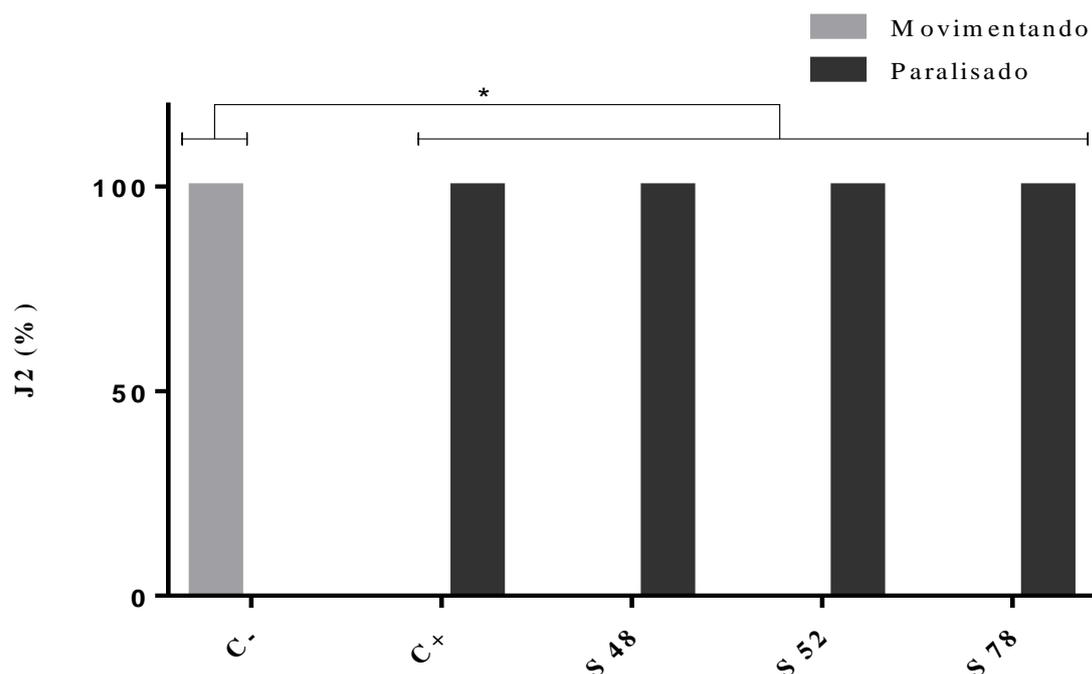


Figura 11 – Bioensaio de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre J2 de *Meloidogyne enterolobii*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

Os ECAs provenientes das sementes que se mostraram efetivas para o controle de *M. incognita* e *M. javanica*, tiveram sua ação nematotóxica (nematicida e/ou nematostática) determinada pelo bioensaio *in vitro* de recuperação. Todos os ECAs das sementes S48, S52 e S78, apresentaram ação nematicida sobre os J2 de *M. enterolobii*, com atividade de 100%, 88% e 96% para cada ECA respectivamente (Figura 12). Nesse sentido, o ECA identificado como S 48 foi o que apresentou o maior potencial nematicida para o controle dos J2 das diferentes espécies de *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*.

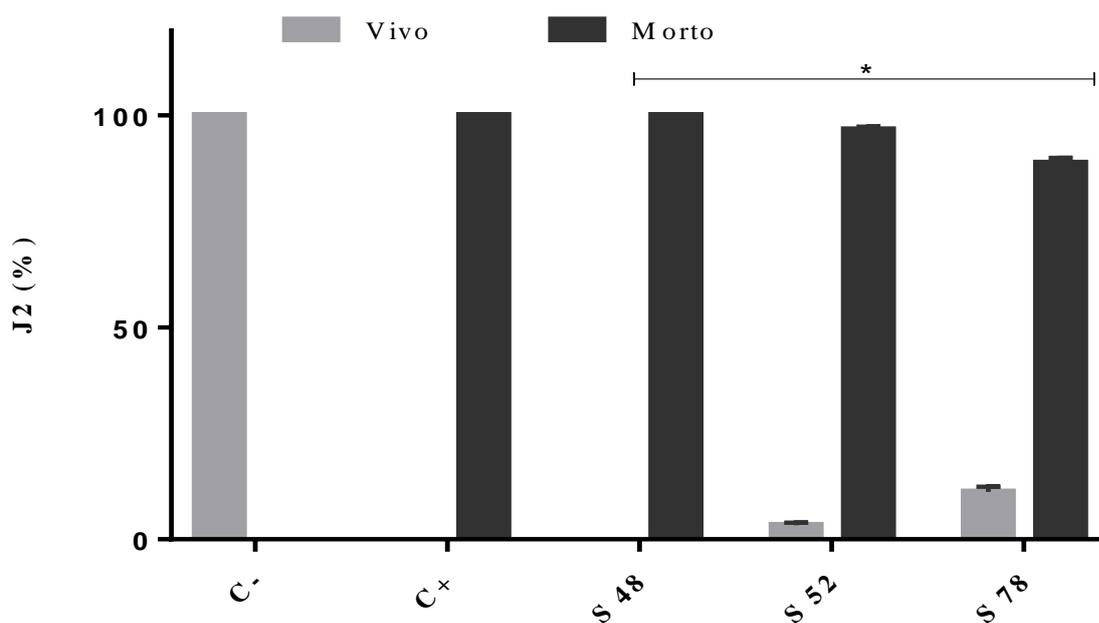


Figura 12 – Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne enterolobii*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. Bioensaio realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

5.5 Curva de concentração para avaliação da menor concentração nematotóxica e DL_{50} dos ECAs sobre juvenis de *Meloidogyne incognita*

A avaliação da menor concentração efetiva sobre J2 de *M. incognita* e a dose letal inibitória (DL_{50}) foi realizada por meio de uma curva de concentração dos ECA's ativos de sementes S48, S52 e S78, de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, que exibiram atividade acima de 90% para a concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$. Nesse sentido, os ECA's ativos de sementes foram avaliados em bioensaio de viabilidade e recuperação *in vitro* contendo em média 100 ± 5 J2 de *M. incognita* nas seguintes concentrações: 100, 250, 500 e 1000 de $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$. O bioensaio de viabilidade demonstrou a paralisação acima de 97% dos J2 de *M. incognita* para todas as concentrações dos ECA's testadas, tendo a presença de nematoides movimentando apenas nas amostras referentes ao ECA S52 nas concentrações de 100 e 250 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$ (Figura 13).

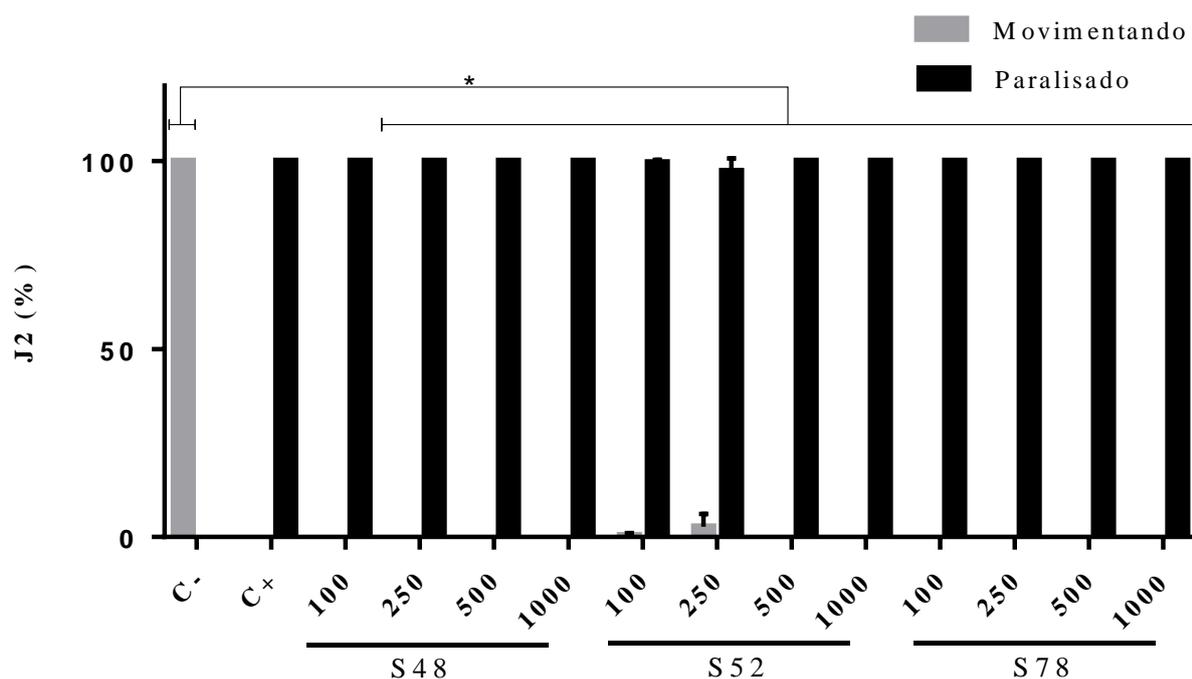


Figura 13 – Bioensaio *in vitro* de viabilidade dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae em diferentes concentrações (100, 250, 500 e 1000 mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. O bioensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.

No bioensaio de recuperação para à curva de concentração referente aos ECA's ativos provenientes das sementes, observou-se que o ECA de S48 na concentração de 1mg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, foi o único capaz de matar 100% dos J2 de *M. incognita*, sendo o ECA mais promissor para o controle desse fitonematoide, seguido pelos ECA's S52, com 98%, e S78 com 91% de atividade nematicida para essa concentração. Adicionalmente o ECA S48 foi o único que apresentou ação nematicida significativa na concentração de 500 µg.ml⁻¹ em 500 µl/VF, com atividade superior a 90%, enquanto os ECA's S52 e S78 tiveram mais de 80% dos J2 recobrando a motilidade pós ensaio de recuperação. As demais concentrações; 100 e 250 µg.ml⁻¹ em 500 µl/VF não apresentaram ação nematicida considerável, sendo aferida apenas uma ação nematostática, com a grande maioria dos J2 recobrando a motilidade, chegando até a 98% de recuperação nessas concentrações para o ECA S78 (Figura 14)

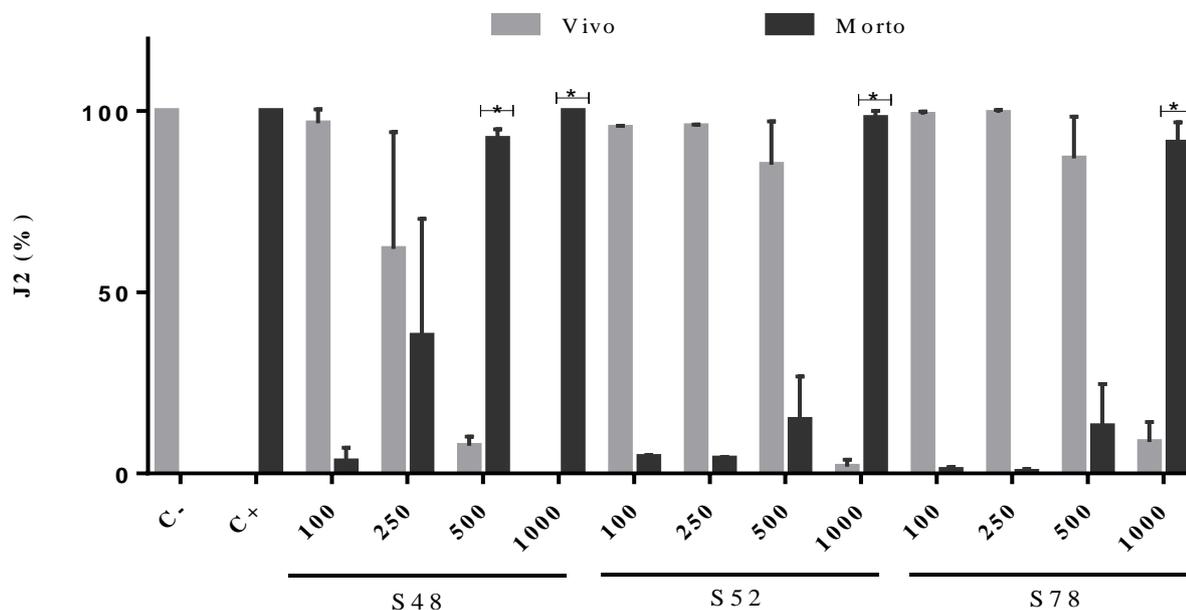


Figura 14 – Bioensaio *in vitro* de recuperação para atestar a atividade nematotóxica (nematostática e/ou nematicida) dos ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, em diferentes concentrações (100, 250, 500 e 1000 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em 500 $\mu\text{l}/\text{VF}$) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

A dose letal inibitória (DL_{50}) correspondendo ao teste de avaliação da toxicidade dos referidos ECAs está representada na Tabela 2. O ECA de semente do acesso 48 apresentou a menor DL_{50} , de $108.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sendo avaliada em $698.8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para o ECA de semente do acesso 52, e variando entre 612.3 a $745.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabela 2. Dose inibitória letal média (DL_{50}) dos ECAs de sementes dos acessos (48, 52 e 78) sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

| Tratamentos | DL_{50} |
|-------------|--|
| S48 | $108.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ |
| S52 | $698.8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ |
| S78 | $678.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ |

5.6. Avaliação da termoestabilidade dos ECA's ativos provenientes de sementes sobre *Meloidogyne incognita*

Os ECAs ativos provenientes de sementes dos acessos (S48, S52 e S78) foram avaliados quanto à estabilidade térmica da ação nematotóxica, em bioensaios de viabilidade e recuperação *in vitro*, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, contendo em média 100 ± 5 J₂ de *M. incognita*. Os ECAs ativos das sementes, após aquecidos a 50°C por 24 horas, foram submetidos a bioensaio de viabilidade, e demonstraram ação paralisante em 100 % dos J₂ de *M. incognita*, após 48 horas de exposição (Figura 15).

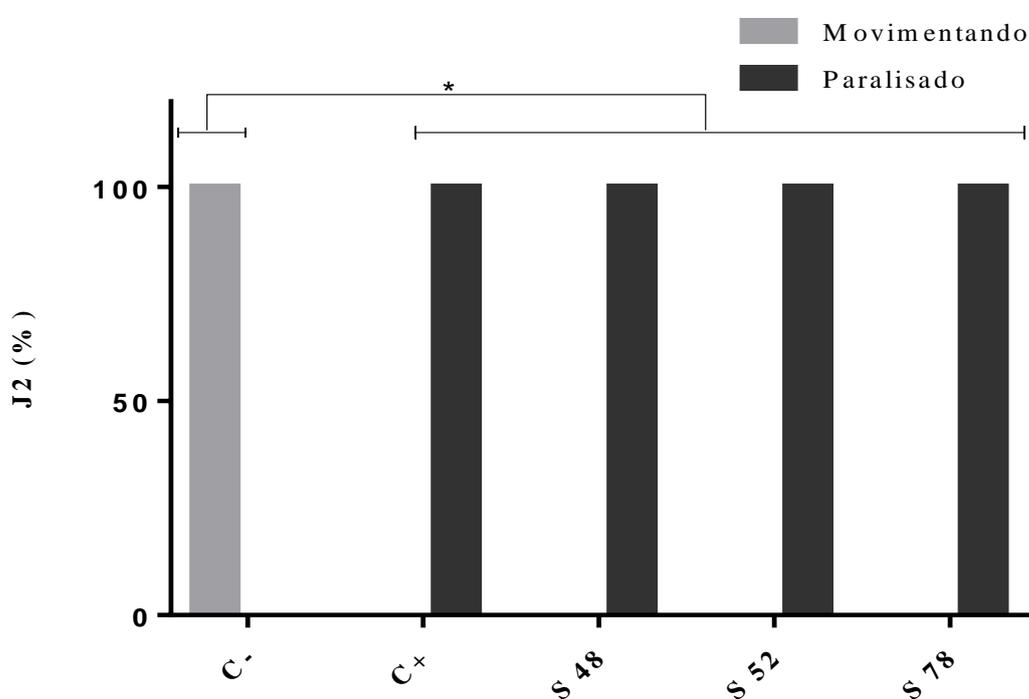


Figura 15 – Bioensaio de viabilidade dos ECAs ativos provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, tratados termicamente por 24 horas a 50°C , após 48 horas de exposição sobre juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C⁻) dH₂O; e controle positivo (C⁺) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

O bioensaio de recuperação dos J₂ submetidos aos ECAs ativos provenientes de sementes dos acessos (S48, S52 e S78) tratados termicamente, demonstraram que a ação nematicida desses extratos são termoestáveis, mantendo a atividade sobre os J₂ de *M. incognita* para a concentração de $1\text{mg}/\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, após 24 horas da recuperação das amostras. A

atividade nematicida foi constatada para todos os ECAs tratados termicamente, com 100 % dos J2 mortos para o ECA - S48, 98% para o ECA-S52, e 91% para o ECA-S78 (Figura 16).

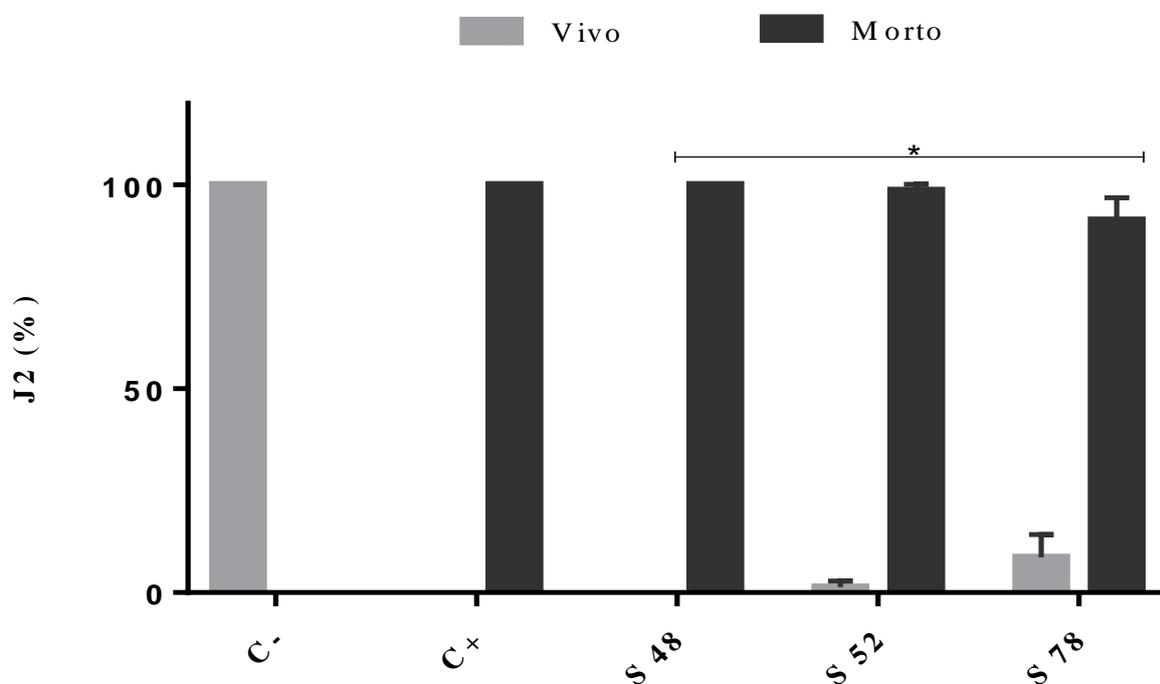


Figura 16 – Bioensaio de recuperação dos nematoides tratados com os ECAs provenientes de sementes dos acessos (48, 52 e 78), para atestar a estabilidade térmica da ação nematicida sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, 24 horas, após a realização do bioensaio *in vitro* de viabilidade. Bioensaio realizado em triplicata, na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em $500\ \mu\text{l}/\text{VF}$, tendo como controle negativo (C-) dH_2O ; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70%. Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

5.7. Avaliação da reação dos acessos de Solanaceae utilizados para obtenção dos ECA's

Os resultados do bioensaio de avaliação da reação de resistência ou suscetibilidade dos acessos apresentaram valores bem inferiores quando comparados ao controle com *Nicotiniana tabacum*, considerada uma espécie altamente suscetível a infecção por *Meloidogyne* spp. Os acessos 48 e 52 obtiveram reação considerada resistente com $\text{FR} < 1$, sendo os outros acessos 11 e 78, considerados suscetíveis ao *Meloidogyne incognita* com $\text{FR} > 1$. Adicionalmente os acessos 48 e 52 apresentaram as menores quantidades de Total NOJ2, NMO e NOJ2/GR, tendo o acesso 48 se destacado também quanto ao NG (Tabela 2).

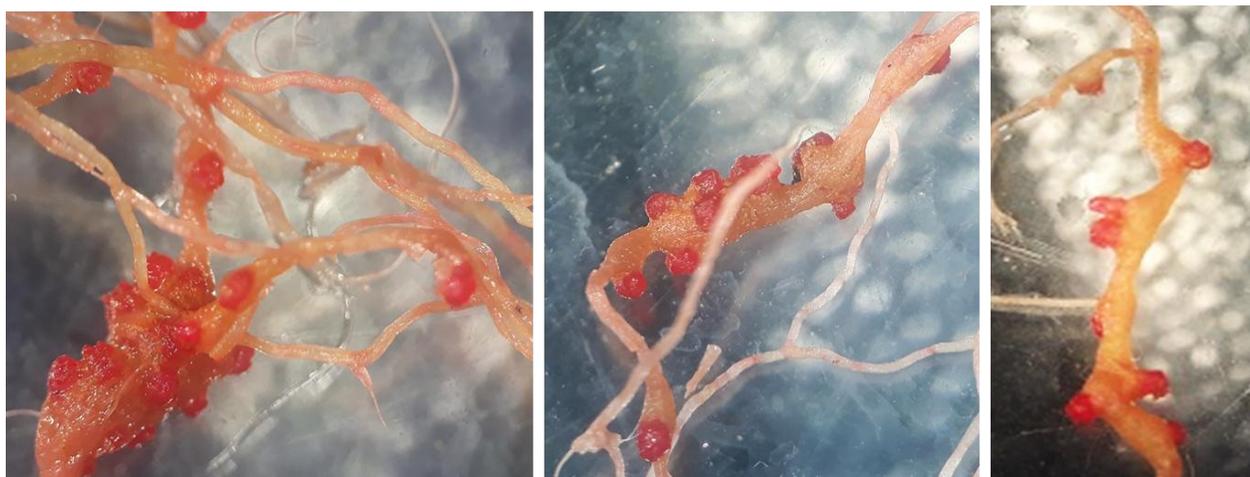


Figura 17. Sintoma e sinais da infecção de *Meloidogyne incognita* em raiz de tabacco (utilizada como controle negativo (C-) no ensaio para aferir a reação ao nematoide (resistente ou suscetível) dos acessos utilizados para a obtenção dos ECAs. Na imagem é possível visualizar as massas de ovos coradas em vermelho (por floxina B), e a presença de galhas radiculares como reação da planta a infecção (Fotos: Paula Ferreira).

Os resultados foram obtidos a partir da média dos acessos, tendo sido realizados em quintuplicata (x5), a partir da contagem dos valores totais de cada variável avaliada. Vale enfatizar ainda, que a reação obtida para cada acesso, de um modo geral, está em concordância com as quantidades total de NOJ2, NGM, NMO, NOJ2/GR, sendo que os menores valores dessas variáveis foram obtidos para os acessos com reação de resistência, e os maiores valores para os acessos com reação de suscetibilidade (Tabela 3).

Tabela 3. Reação dos acessos de uma espécie de Solanaceae ao nematoide *M. incognita*

| Plantas | Total NOJ2 | NG | NMO | NOJ2/GR | ¹ FR | ² Reação |
|----------------------------|------------|-------|-------|---------|-----------------|---------------------|
| <i>Nicotiniana tabacum</i> | 74380 | 588.4 | 798.2 | 1852.06 | 23.24 | S |
| Acesso 11 | 6420 | 213.2 | 118.7 | 96.38 | 1.87 | S |
| Acesso 48 | 2382 | 104.4 | 50.8 | 34.82 | 0.74 | R |
| Acesso 52 | 1277 | 163.7 | 77,0 | 28.03 | 0.39 | R |
| Acesso 78 | 6161 | 110.8 | 75.6 | 144.59 | 1.91 | S |

¹Fator de Reprodução (FR=Pf/Pi) (Oostenbrink,1966).

²Classificação de Oostenbrink (1966). S: Suscetível (FR>1); R: Resistente (FR<1); I: Imune (FR = 0)

*Inoculação inicial (3200 J2 de *M. incognita*).

As plantas utilizadas na análise da reação desses acessos (11, 48, 52 e 78) a *Meloidogyne incognita* (x5), foram clonadas por estaquia, e estão acondicionadas em casa de vegetação para estudos posteriores.

5.8. Avaliação de toxicidade dos ECAs ativos sobre hemácias

A avaliação da toxicidade dos ECAs ativos provenientes de sementes (S) dos acessos (48, 52 e 78) sobre hemácias bovina, foi realizada com uma curva de concentração (1,5 mg, 1,0 mg, 500 µg, 250 µg e 100 µg) dos ECAs resuspendidos em solução fisiológica, sendo adicionado aos poços de placa de ELISA contendo o concentrado de hemácias. Todos os ECAs avaliados nas diferentes concentrações não apresentaram capacidade hemolítica significativa, com mais de 80 % das células permanecendo viáveis para todas as concentrações dos ECA testados (Figura 18). A solução fisiológica de NaCl não apresentou turbidez considerável para todas as amostras, com a absorbância mantendo-se entre 0,01 e 0,1nm, certificando-se a baixa ruptura de hemácias, que permaneceram íntegras no fundo da placa de ELISA.

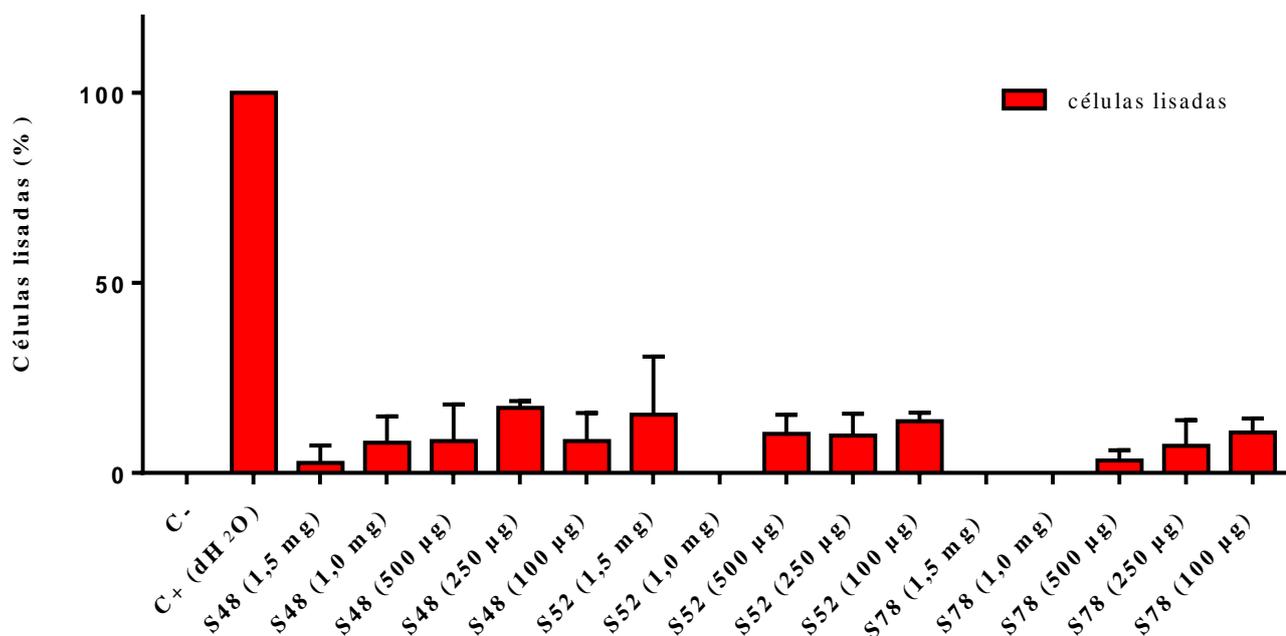


Figura 18 – Avaliação de citotoxicidade dos ECAs ativos de sementes dos acessos de uma espécie pertencente à família Solanaceae, sobre hemácias bovinas em diferentes concentrações (1,5 mg, 1,0 mg, 500 µg, 250 µg e 100 µg). Os ECAs ativos foram resuspendidos em solução fisiológica (NaCl), que também foi utilizada como controle negativo (C-), sendo dH₂O, o controle positivo (C+).

5.9. Avaliação de toxicidade dos ECA's ativos em juvenis de *Meloidogyne incognita* sobre células do ovário de *Spodoptera frugiperda*

A avaliação da toxicidade dos ECA's ativos provenientes de sementes (S) dos acessos (48, 52 e 78) sobre células do ovário de *Spodoptera frugiperda*, foi realizada com a mesma

concentração utilizada nos bioensaios com J2 de *M. incognita*, sendo adicionado 20 µl contendo 1mg do material em poços de placa de ELISA, contendo 100 µl de meio de cultura com o concentrado de células. Nesse bioensaio, estimou-se a viabilidade das células após o contato prolongado com os ECA's ativos de sementes, onde o ECA da S48 apresentou menor quantidade de células viáveis, com cerca de 71%. Já os ECA's S52 e S78 apresentaram viabilidade celular superior a 90%, com cerca de 94% e 98% respectivamente (Figura 19).

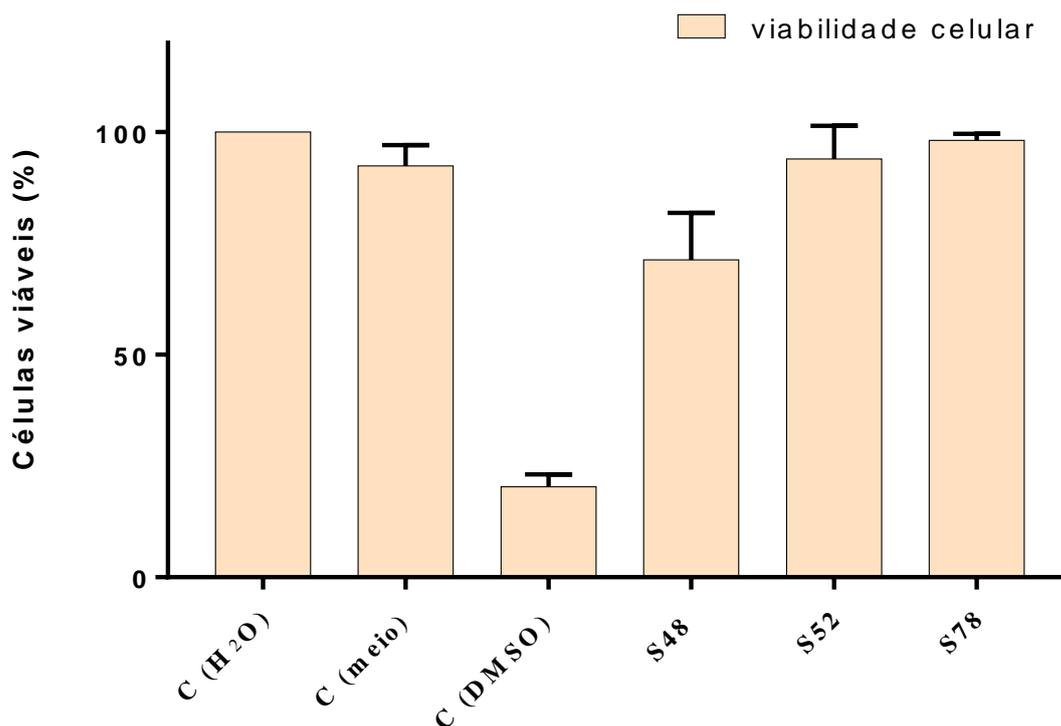


Figura 19 - Avaliação de citotoxicidade *in vitro* dos ECAs ativos de sementes, provenientes de acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae, sobre células do ovário de *Spodoptera frugiperda*. Para esse ensaio, foram utilizados dH₂O para curva de calibração, meio contendo as células sem tratamento (C-) e DMSO (C+). A viabilidade celular foi mensurada considerando-se a absorbância detectada por espectrofotômetro para cada tratamento, e a concentração dos ECAs para esse ensaio foi a mesma utilizada para o controle dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, sendo aplicada 1 mg. ml⁻¹.

5.10 Avaliação de toxicidade dos ECA's oriundos de sementes em Queratinócitos humanos (HaCat)

A ação de toxicidade dos ECAs provenientes de sementes (S) dos acessos (11, 48, 52 e 78) foi testada sobre queratinócitos de linhagem HaCat, nas seguintes concentrações: 125, 250, 500, e 1000 µg.ml⁻¹. O ensaio foi realizado *in vitro*, para certificar a viabilidade celular de HaCat

isolados da pele de humano adulto. Os resultados demonstraram efeito citotóxico dose independente, sendo que o ECA S11 apresentou considerável diminuição da viabilidade celular, com quase 50% de ação citotóxica na concentração de $1000 \mu\text{g/ml}^{-1}$. A viabilidade das células de HaCat aumentaram de acordo com a diminuição das concentrações dos ECA's, sendo o ECA S78 o que apresentou o menor efeito citotóxico, para a concentração de $250 \mu\text{g/ml}^{-1}$ foi observado o resultado mais próximo ao do controle com H_2O (Figura 20).

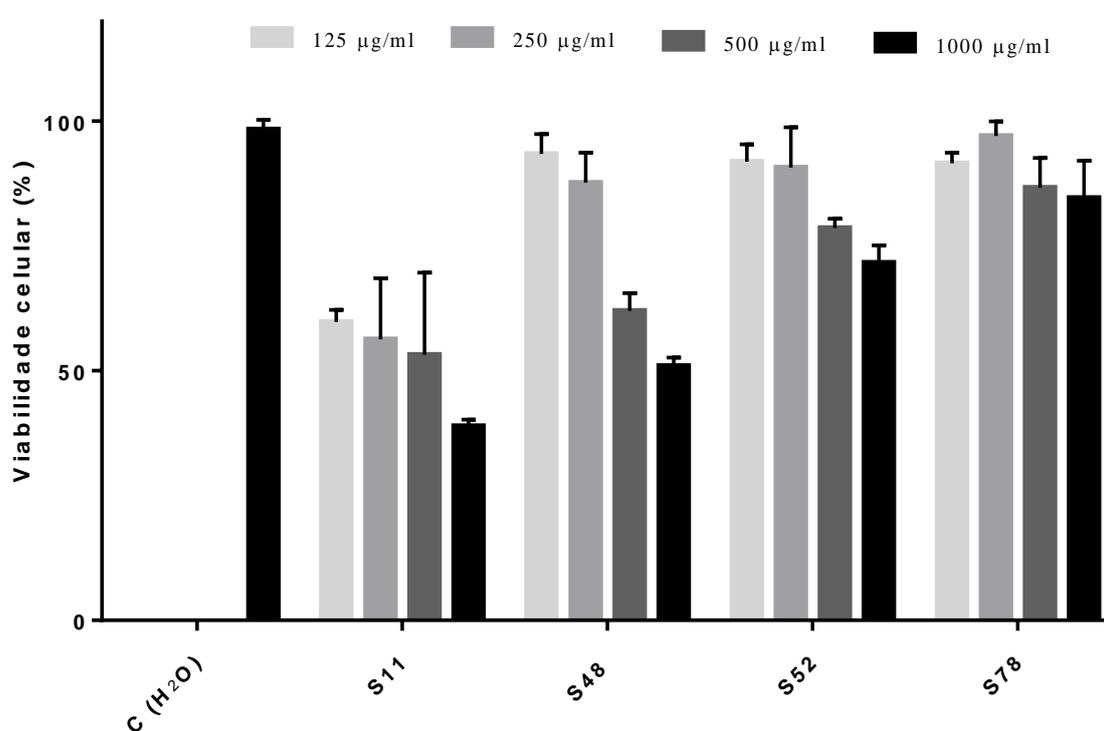


Figura 20 - Citotoxicidade dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre Queratinócitos humanos (HaCat). O ensaio foi realizado em diferentes concentrações dos ECAS ($125, 250, 500, \text{ e } 1000 \mu\text{g/ml}^{-1}$), sendo o período de exposição dos queratinócitos aos ECAs de 48 horas, sendo H_2O utilizada para a curva de calibração. Diferença significativa quando comparados os grupos entre si pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste Tukey $p < 0,05$.

5.11. Avaliação da fitotoxicidade dos ECA's oriundos de sementes sobre a germinação de soja (*Glycine max*)

O resultado do bioensaio de fitotoxicidade não demonstrou nenhum efeito dos ECAs sobre a germinação de soja para a concentração de (1mg.ml^{-1}) em ensaio *in vitro*, sendo a germinação das sementes dentro da normalidade para todos os tratamentos. Adicionalmente, constatou-se

que as plantas de todos os tratamentos tiveram desenvolvimento superior ao controle negativo (C-), com relação ao tamanho, sendo a média de 114 mm para C-, 122,2 mm para S11, 138,2 mm para S48, 118,32 mm para S52 e de 122,2 mm para S78 (Tabela 3 e Figura 21). Proporcionalmente, as médias referentes ao peso fresco e peso seco de raiz, e peso fresco e peso seco total foram superiores nos tratamentos em relação ao C-, demonstrando que os ECAs não inibem o desenvolvimento normal dessas plântulas (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação de fitotoxicidade das variáveis das plântulas de soja tratadas com 1 mg dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae em meio MS, com 15 dias pós-semeadura.

| Tratamentos | M.C.A (mm) | P.F/Raiz (g) | P.F/ Total (g) | P.S/ Raiz (g) | P.S/ Total (g) |
|-------------|------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| C- | 114 | 0.29 | 1.26 | 0.02 | 0.13 |
| S 11 | 122.2 | 0.81 | 1.96 | 0.04 | 0.32 |
| S 48 | 138.2 | 0.48 | 1.65 | 0.04 | 0.20 |
| S 52 | 118.3 | 0.81 | 2.17 | 0.06 | 0.22 |
| S 78 | 122.2 | 0.33 | 1.35 | 0.03 | 0.17 |

M.C.A: Medida colo ao ápice (mm), **P. F/ Raiz (g):** peso fresco radicular em gramas, **P. F/ Total (g):** peso fresco total, **P.S/Raiz (g):** peso seco radicular em gramas, **P. F/ Total (g):** peso fresco total em gramas.

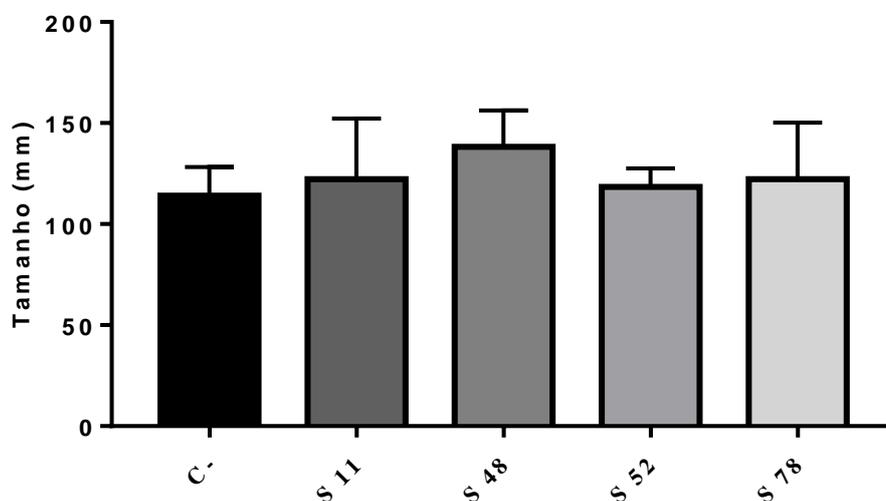


Figura 21 - Efeitos dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae na germinação de soja (*Glycines max*), onde avaliou-se o crescimento do colo ao ápice das plântulas de soja, 15 dias após o cultivo das sementes em meio MS, tratadas com 1mg/ml⁻¹ dos ECAs, na mesma concentração utilizada nos bioensaios *in vitro* sobre *Meloidogyne incognita*.

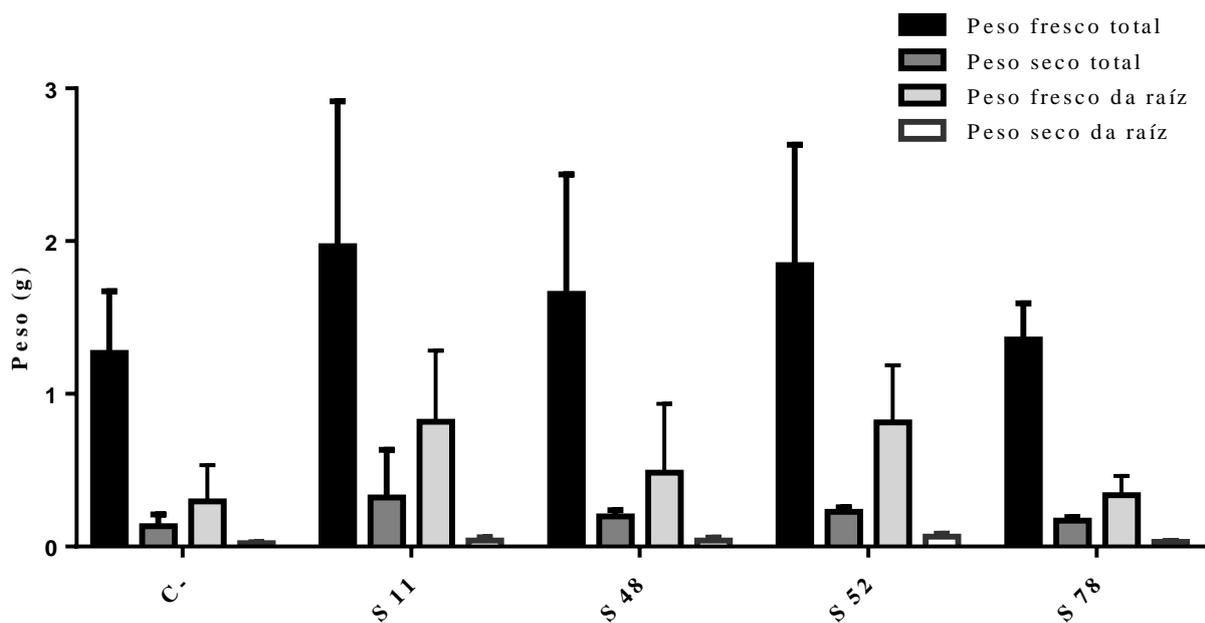


Figura 22. Média dos pesos fresco e seco das raízes, e pesos fresco e seco total das plântulas de soja (*Glycine max*), 15 dias após o cultivo das sementes em meio MS, tratadas com 1mg/ml^{-1} dos ECAs das sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae.

Na figura abaixo está representado o bom desenvolvimento radicular das plântulas tratadas com os ECA's de sementes dos acessos 11, 48, 52 e 78 de uma espécie de Solanaceae, não havendo indícios da ação fitotóxica desses extratos para a germinação das sementes, sendo o desenvolvimento das plântulas considerado.



Figura 23 - Plântulas de soja germinadas em meio MS, tratadas com 1mg/ml^{-1} dos ECAs de sementes dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae. Da esquerda para a direita; plântulas tratadas com H_2O (C-), e ECAs S11, S48, S52 e S78. (Fotos: Paula Ferreira).

5.12. Bioensaio de especificidade dos ECAs contra organismos não-alvo.

5.12.1 Avaliação da ação dos ECA's ativos utilizando estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079)

Ensaio para aferir a especificidade dos ECA's sobre organismos não-alvos foi realizado, com bactérias benéficas do solo da espécie; *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA -5079). Os resultados dos bioensaios de especificidade sobre organismos não alvo demonstraram que os ECAs ativos para *M. incognita* não inibiram o crescimento da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) cultivada em placa. Não foi constatado a presença de halos de inibição ao redor dos discos contendo os ECAs e sim a formação de um tapete que cobriu toda a extensão das placas de Petri (Figura 24).

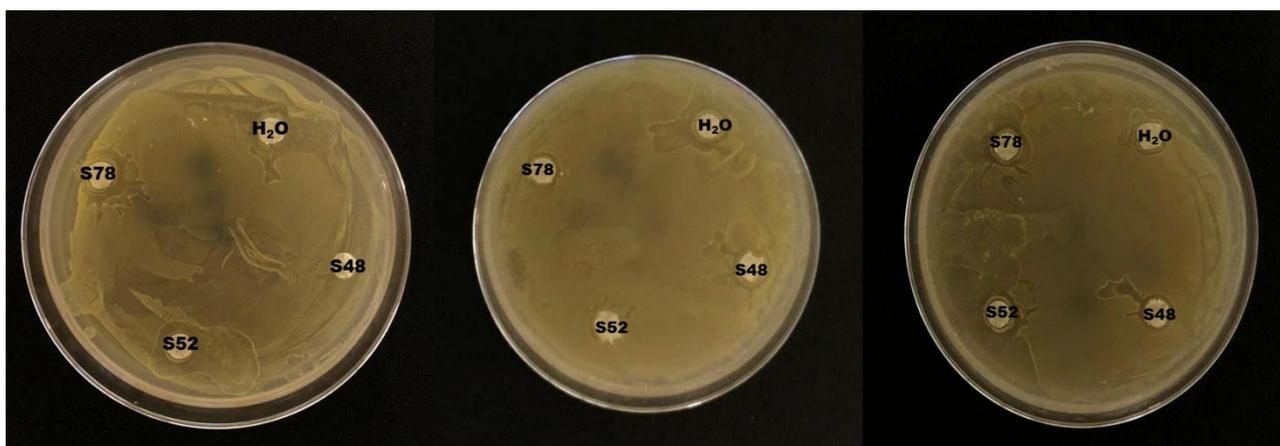


Figura 24 - Bioensaio *in vitro* utilizando os ECAs (1mg/ml^{-1}) provenientes de sementes dos acessos ativos para *Meloidogyne incognita* (S48, S52 e S78) de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA-5079), cultivada em meio TY por 48 horas. O controle negativo para esse bioensaio foi H_2O (estéril). Os ECAs e o controle foram dispensados sobre discos de papel filtro no meio de cultivo bacteriano, sendo mantidos por 48 horas na temperatura de 28°C (Fotos: Paula Ferreira).

5.12.2 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre *Trichoderma* (*T. asperellum* - CEN 162 e *T. harzianum* - CEN 267)

Ensaio para verificar o efeito da ação dos ECA's ativos de sementes dos acessos (48, 52 e 78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, sobre o

desenvolvimento de fungos benéficos do solo (*T. asperellum* e *T. harzianum*) foram realizados. Os resultados correlacionados à ação dos ECAs ativos de sementes dos acessos (S48, S52 e S78) provenientes de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, não demonstraram nenhum efeito inibitório sobre o crescimento micelial dos fungos benéficos do solo (*T. asperellum* e *T. harzianum*). De fato, os referidos microrganismos cresceram normalmente cobrindo toda placa de Petri fato observado também para os controles do bioensaio (Figura 25).

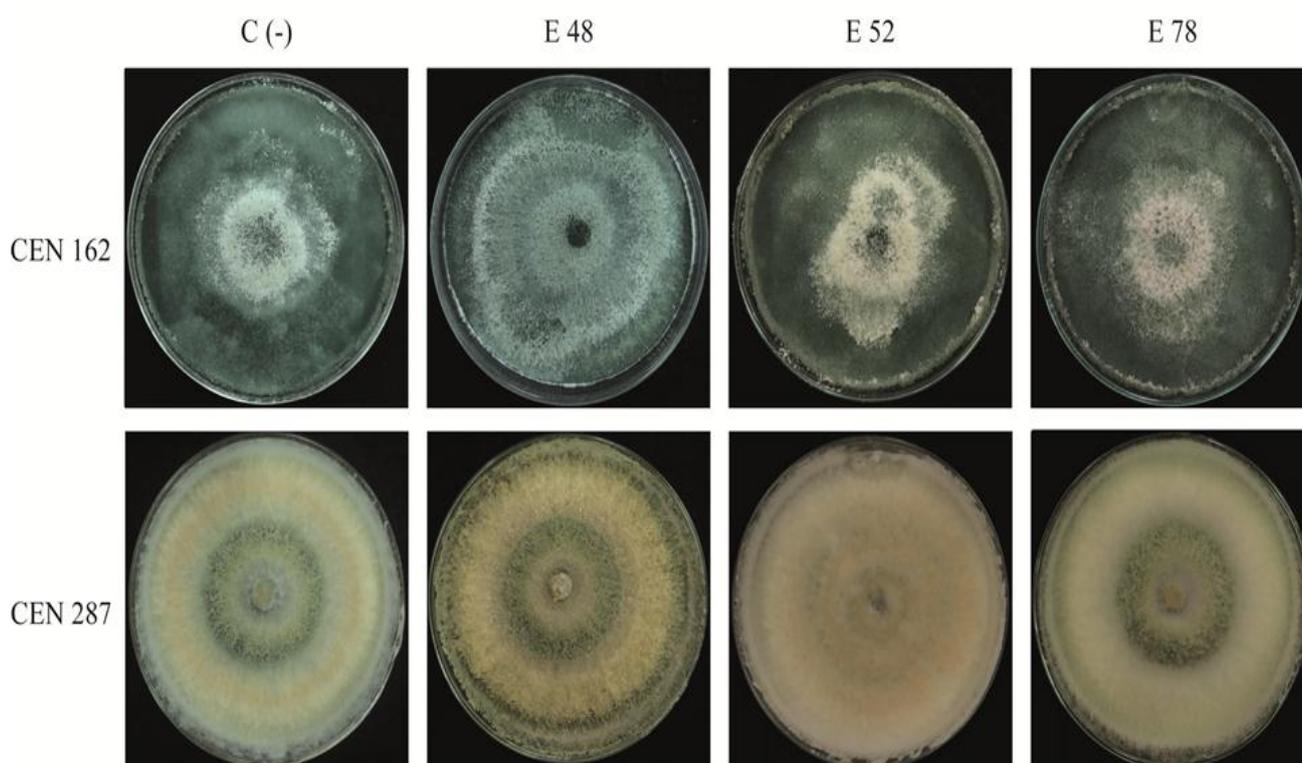


Figura 25 - Crescimento micelial de *Trichoderma asperellum* (162) e *T. harzianum* (287) em meio batata dextrose ágar (BDA) com 10 mg dos ECAs de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de plantas da família Solanaceae (Fotos: Paula Ferreira).

5.12.3 Avaliação da ação dos ECA's ativos sobre *Candida maltosa* (CA 49)

Ensaio de especificidade sobre organismos não alvo da ação dos ECA's ativos utilizando levedura presente no solo *Candida maltosa* (CA 49) foi realizado. Os resultados demonstraram que os ECAs ativos para *M. incognita* não inibiram o crescimento da levedura cultivada em placa, uma vez que não foi constatado a presença de halo na região onde os ECAs foram adicionados, tendo a levedura crescido normalmente e ocupado toda a placa (Figura 25)

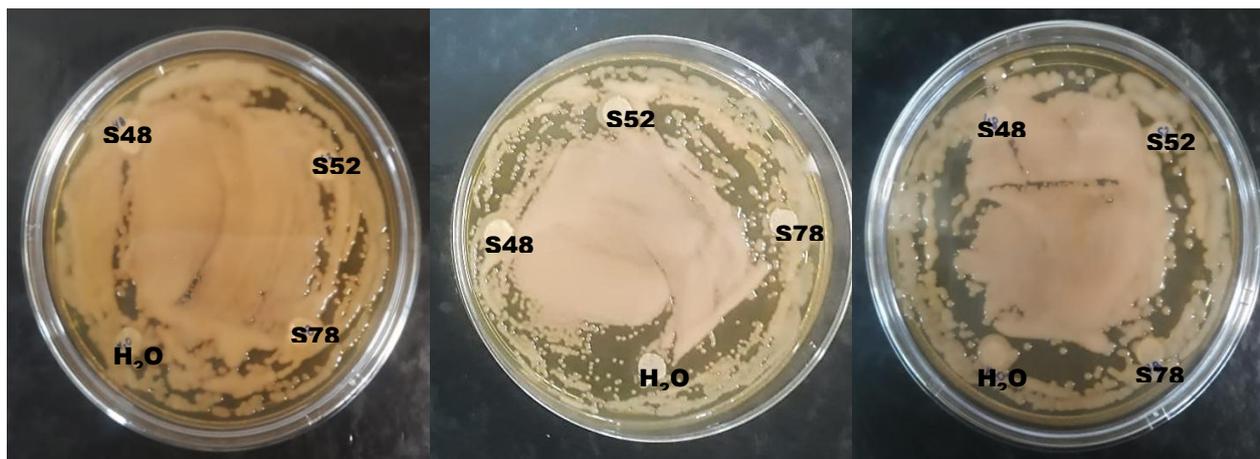


Figura 26 - Bioensaio *in vitro* utilizando os ECAs ativos das sementes dos acessos (S48, S52 e S78) de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre o crescimento de *Candida maltosa* (CA 49). Os ECAs foram dispensados na mesma concentração utilizada nos bioensaios *in vitro* com *M. incognita* ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), sobre discos de papel filtro, fixados no meio YPD, onde a levedura foi cultivada. Sobre os discos está a identificação de cada ECA utilizado, sendo H₂O (estéril) utilizada como controle negativo. (Fotos: Paula Ferreira).

5.13. Ação das frações resultantes da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) - Coluna de exclusão molecular, sobre J2 de *M. incognita*

Considerando os resultados obtidos para os distintos bioensaios utilizando o acesso 48, o ECA ativo deste acesso foi selecionado para a purificação cromatográfica via CLAE com coluna de exclusão molecular GE Healthcare Superdex™ 200 (10/300 GL). Foram realizadas corridas cromatográficas de 80 minutos com a coleta dos diferentes picos em tubos de microcentrífuga de acordo com a absorbância pelos diferentes espectros utilizados durante a corrida (216, 254 e 280 nm), e o tempo de retenção, separando assim os componentes do ECA ativo de acordo com as classes químicas (Figura 27).

A purificação do ECA de semente do acesso 48 de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, resultou na obtenção de 11 picos (frações cromatográficas), que foram rotavaporizados, e utilizadas nos bioensaios viabilidade e de recuperação sobre J2 de *M. incognita* (Figura 27, 28 e 29).

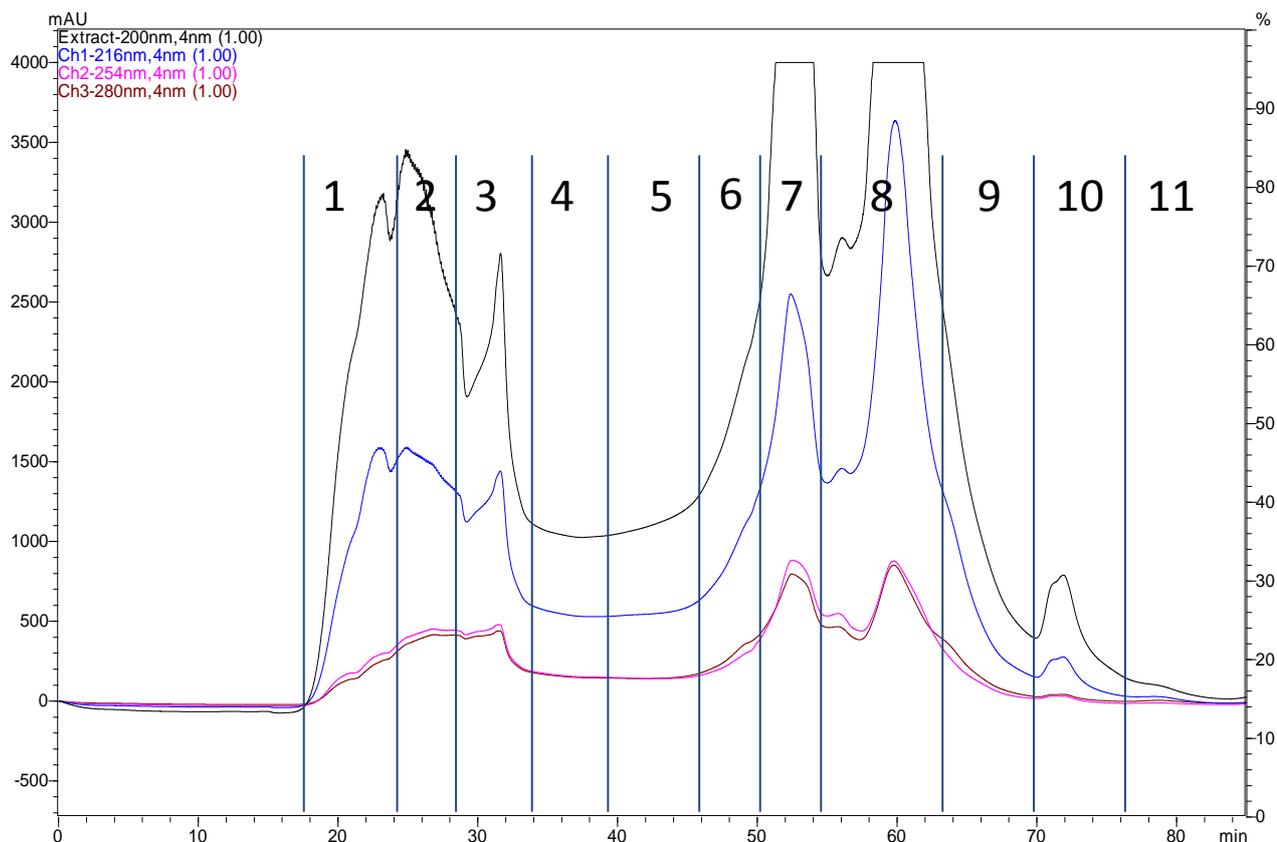


Figura 27 - Cromatograma via HPLC-ME, do ECA da semente do acesso S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae, com 11 frações coletadas nos diferentes tempos de retenção, monitoradas pelos espectros; 216, 254 e 280 nm. A purificação foi realizada, utilizando-se coluna GE Healthcare Superdex™ 200 (10/300 GL).

As frações cromatográficas resultantes do HPLC-ME (11, no total), foram submetidas a bioensaio de viabilidade *in vitro*, onde as frações 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8 exibiram atividade nematostática sobre J2 de *M. incognita*, enquanto as demais frações; 3, 9, 10 e 11, não apresentaram sequer ação paralisante, com mais de 80% dos J2 mantendo-se em movimento. O ensaio foi realizado na concentração de 250 µg do fracionado rotavaporizado, ressuspensão em 25 µl de H₂O (Milli-Q), sendo o bioensaio realizado para 500 µl de VF (Figura 28).

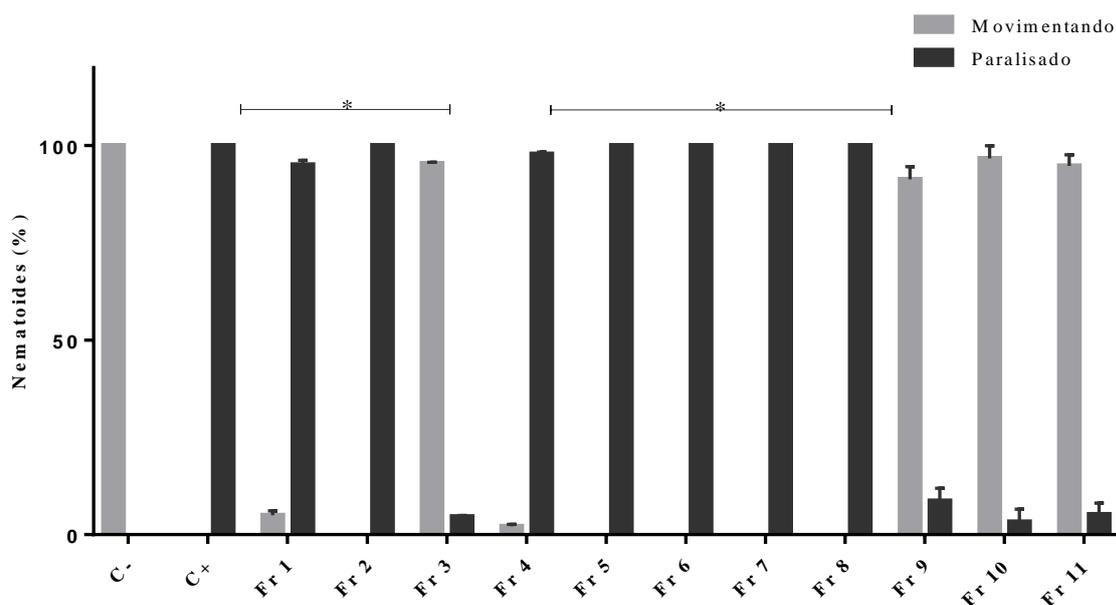


Figura 28 - Bioensaio *in vitro* de viabilidade sobre os nematoides tratados com as Frações (Fr) provenientes do ECA ativo de sementes do acesso 48 de uma espécie de planta da família Solanaceae (resultantes de cromatografia via HPLC-ME), após 48 horas de exposição sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. O bioensaio foi realizado em triplicata, na concentração de 250 µg em 500 µl/VF, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool - EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: p<0,0001.

Bioensaio de recuperação *in vitro* das frações cromatográficas resultantes do HPLC-ME a partir do ECA ativo de semente do acesso 48, foi realizado. Após o ensaio de viabilidade dos J2 de *M. incognita*, tratados com as frações cromatográficas na concentração de 250 µg em 500 µl de VF, esses nematoides foram recuperados, e contados novamente após 24 horas sem o contato com as frações. Os resultados desse ensaio de recuperação demonstraram atividade nematostática para as frações 1, 2, 4, 7 e 8, onde a fração 4 apresentou uma atividade nematocida de apenas 22%, com a grande maioria dos nematoides recuperando a motilidade. As frações 5 e 6 foram as únicas que apresentaram maior taxa de ação nematocida sobre os J2 de *M. incognita*, com 45 % para Fr 5, enquanto que a ação nematocida ficou concentrada na Fr 6, com atividade de quase 100% sobre esses nematoides (Figura 29).

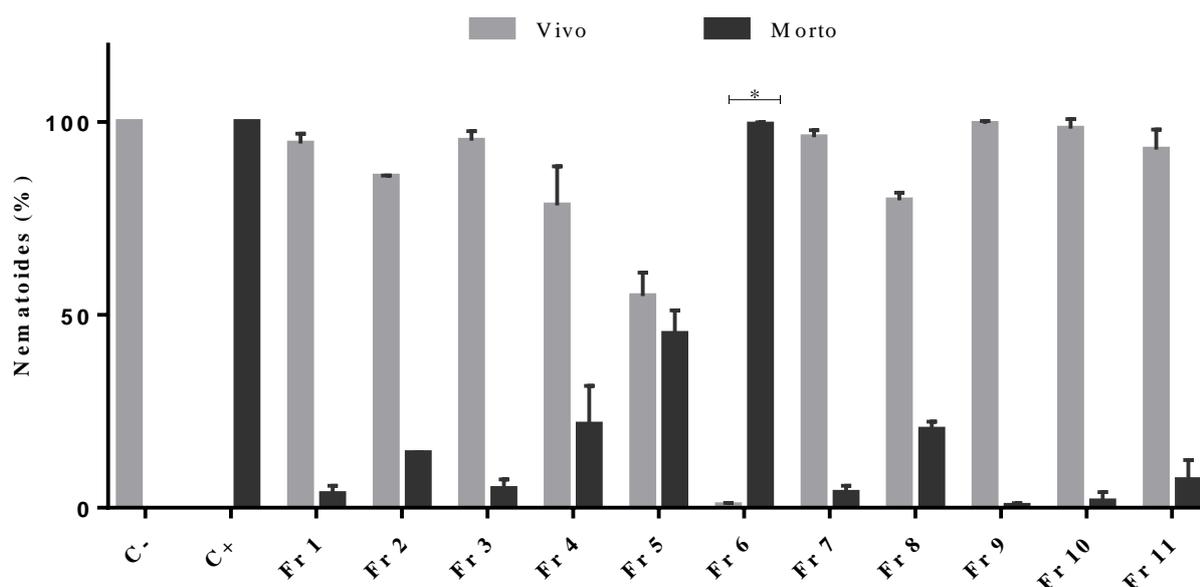


Figura 29. Bioensaio *in vitro* de recuperação dos nematoides tratados com as Frações (Fr) provenientes do ECA ativo de semente do acesso 48 (resultantes de cromatografia via HPLC-ME), após 24 horas da recuperação dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* tratados com as frações na concentração de 250 µg em 500 µl/VF . O bioensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo (C-) dH₂O; e controle positivo (C+) álcool-EtOH 70% . Os dados gerados foram analisados pelo programa estatístico ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado ao controle positivo *: $p < 0,0001$.

5.14. Purificação da fração ativa resultante do HPLC por exclusão molecular via Cromatografia Líquida de Alta Performance de adsorção por fase reversa (HPLC-RP), e identificação das massas moleculares presentes nas frações

A fração com a atividade nematicida concentrada (Fr6), obtida pela purificação cromatográfica via HPLC –ME do ECA ativo de semente do acesso 48, foi novamente fracionado via HPLC, com coluna de adsorção por fase reversa (RP), Jupiter 5µ, C18, 300A, C18 (10 mm x 250 mm) O 20. A corrida realizada com a coluna (C 18) da fração 6 ativa, durou cerca de 35 minutos, e separou a fração em outros 17 picos, com diferentes tempos de retenção e considerando o grau de polaridade dos componentes químicos da amostra, sendo a corrida monitorada por diferentes espectros de 216, 254 e 280 nm (Figura 30).

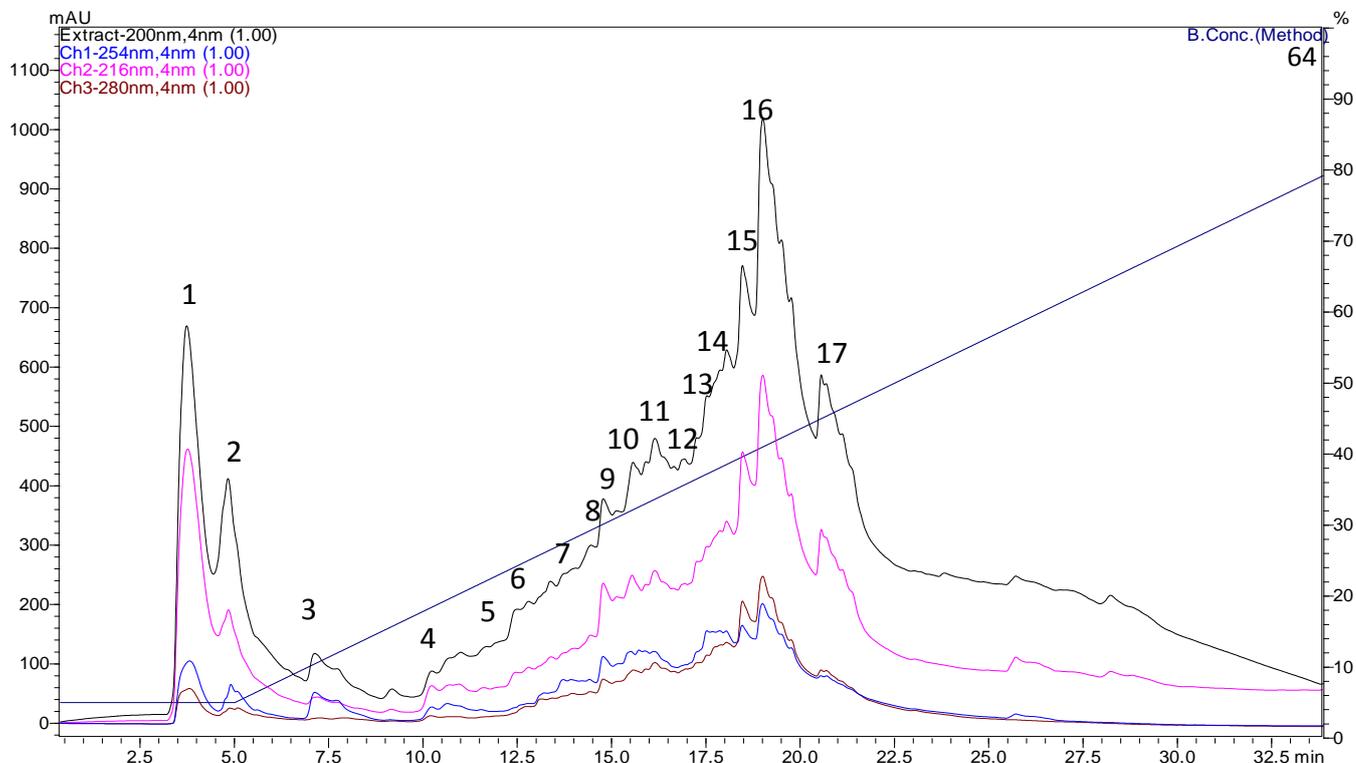


Figura 30. Cromatograma da fração 6 com atividade nematocida concentrada (proveniente do ECA ativo de semente S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae) via HPLC - RP, com 17 frações coletadas nos diferentes tempos de retenção, monitorados pelos espectros; 216, 254 e 280 nm. A coluna empregada foi a (RP), Jupiter 5 μ , C18, 300A, C18 (10 mm x 250 mm) O 20.

As frações resultantes do HPLC-ME e do HPLC- RP foram secadas em placa AnchorChip var/96 MALDI (Bruker Daltonics, Alemanha), até a cristalização das amostras para serem analisadas por espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonics). Considerando os ensaios biológicos de viabilidade *in vitro* e recuperação das frações geradas por HPLC-ME, as massas registradas para a Fr 6 foram selecionadas dentre as demais frações (Figura 31). Adicionalmente, a fração com a atividade nematocida concentrada (Fr6), foi submetida a novo fracionamento via HPLC-RP, resultando em 17 novas frações que também tiveram suas massas mensuradas, para nortear sobre as possíveis classes químicas atuantes na atividade nematocida registrada, sendo detectadas massas apenas para as frações; 4,8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17 (Figura 31, 32 e 33).

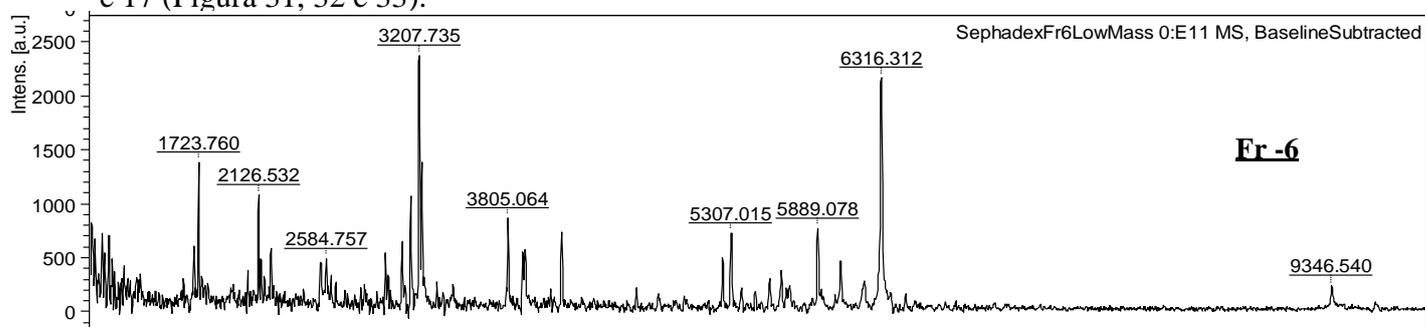


Figura 31 - Espectro de massas via MALDI-TOF da fração 6 – Fr6 (proveniente do ECA ativo de semente S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae) que apresentou atividade nematocida concentrada dentre todas as frações resultantes da purificação via HPLC-ME.

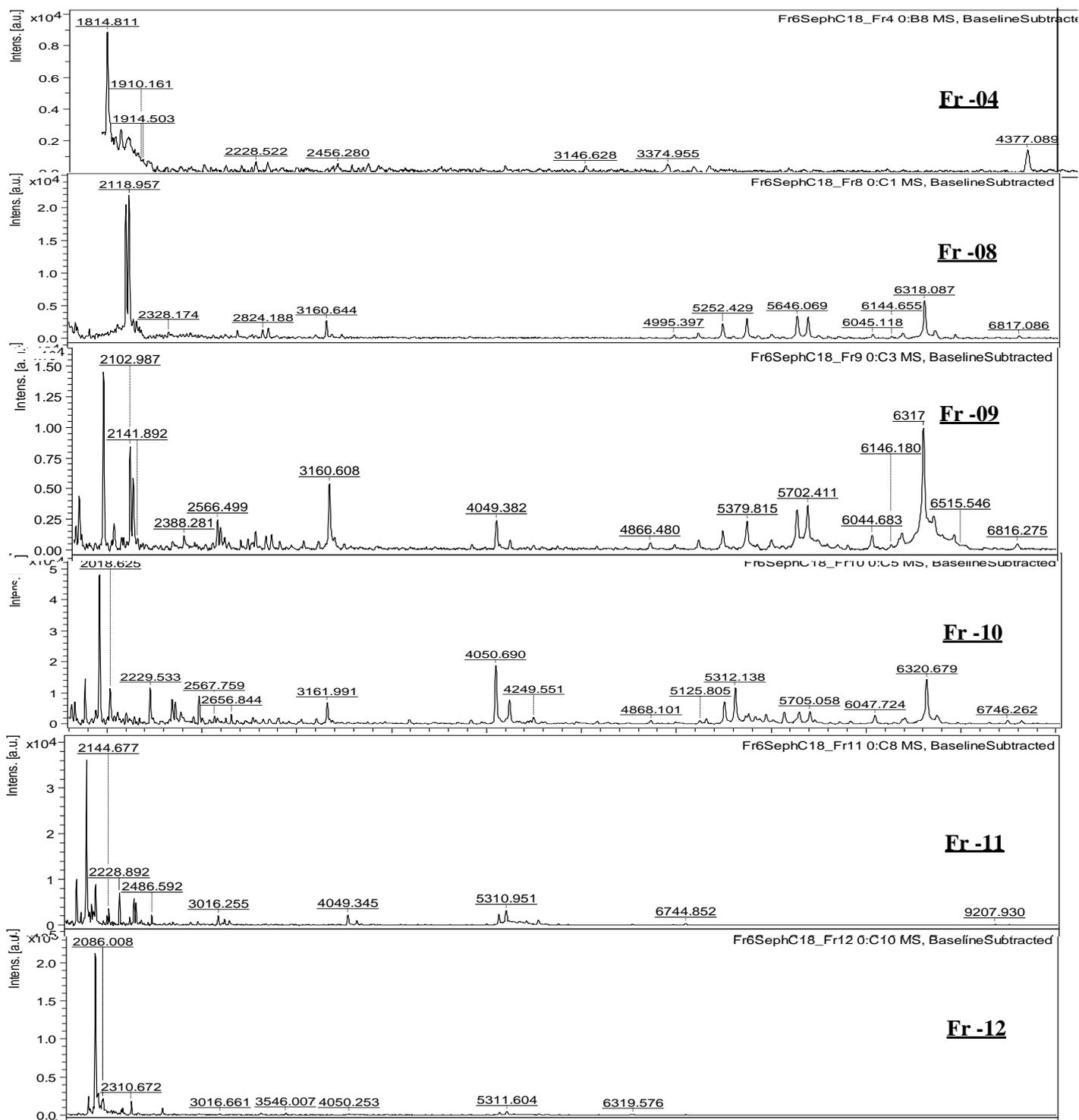


Figura 32. Espectros de massas via MALDI-TOF das frações (4, 8, 9, 10, 11 e 12) obtidas a partir da fração com a atividade nematocida concentrada (Fr6), via HPLC-RP.

As frações resultantes obtidas a partir de refração da Fr6 com a atividade nematocida concentrada, originou 17 frações, que tiveram suas massas mensuradas por espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonics), sendo as frações 15, 16 e

17, as de maior concentração na Fr6 nematicida, sendo o tempo de absorvância desses 3 picos de 18 a 23 minutos (Figura 33).

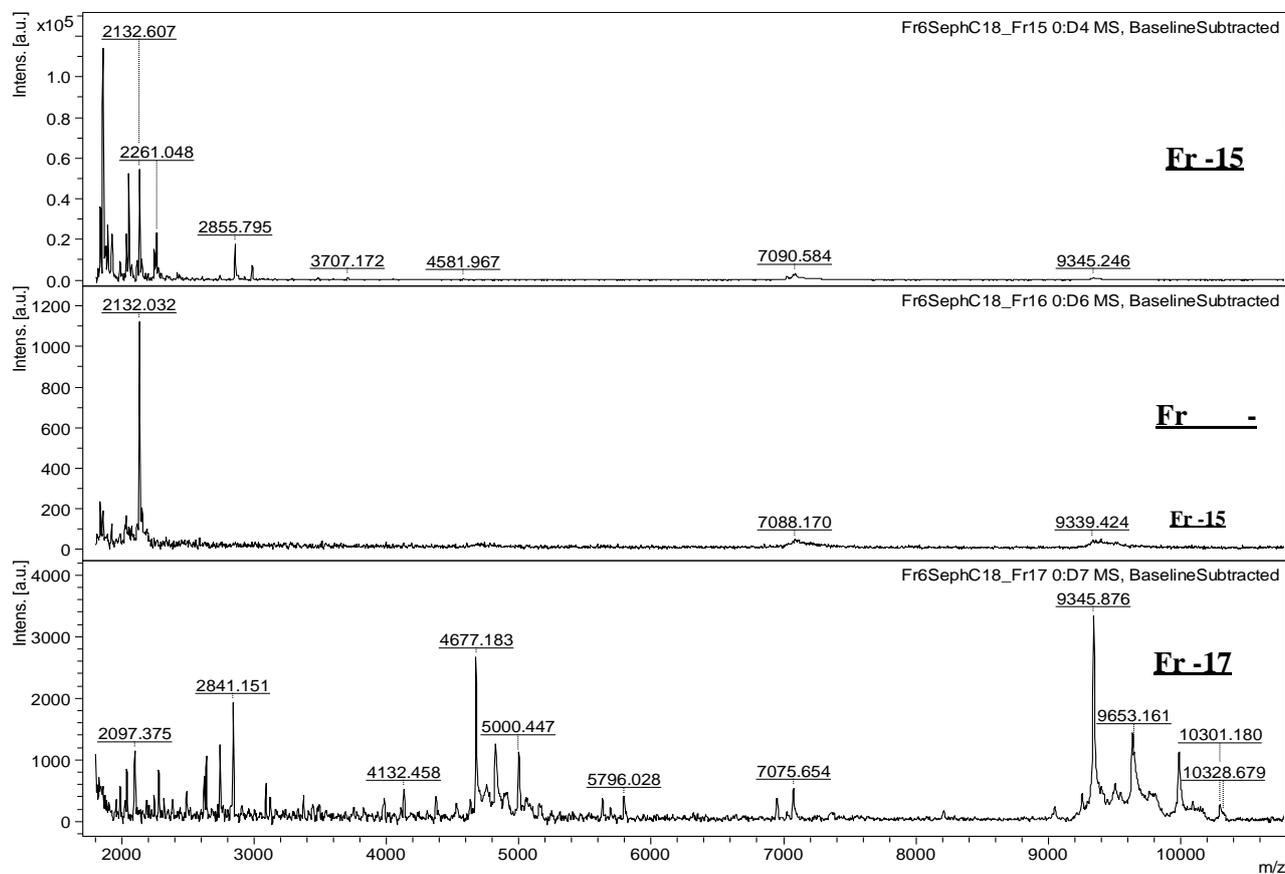


Figura 33 - Espectros de massas via MALDI-TOF das frações majoritárias; (15, 16, e 17) da fração com a atividade nematicida concentrada (fração 6, oriunda do ECA ativo de semente S48 de uma espécie de planta da família Solanaceae), via HPLC-RP.

6.DISCUSSÃO

O presente estudo adiciona contribuições ao arsenal de conhecimentos úteis na elaboração de estratégias de manejo sustentável do nematoide das galhas, o principal grupo de fitonematoides para a agricultura mundial (Jones *et al.*, 2013). Extratos cru aquosos de sementes de acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae, mostraram eficiência na mortalidade de *Meloidogyne* spp. em ensaios *in vitro*. Os resultados mostraram que a eficiência dos princípios ativos variam de acordo com sua origem, mesmo entre acessos de uma mesma espécie vegetal, órgãos da mesma planta, e que a eficiência dos princípios ativos dos extratos pode ser correlacionada à reação de resistência ao nematoide.

Durante os ensaios biológicos de viabilidade, observou-se que a maioria dos J2 de *Meloidogyne* spp. ficaram paralisados, sendo necessário o ensaio biológico de recuperação *in vitro* para confirmar a atividade nematotóxica do extrato. Dias e colaboradores (2000) ressaltam a importância da realização desse ensaio, pois a atividade nematostática observada durante o ensaio de viabilidade não necessariamente implicará numa atividade nematicida, podendo os J2 recobrem a motilidade após o referido ensaio.

Os resultados dos ECAs provenientes de raízes dos acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae, submetidos a ensaios biológicos de viabilidade e recuperação *in vitro*, sobre espécies de *Meloidogyne* spp. não apresentaram atividade nematicida significativa. Em contrapartida, os ECAs oriundos das sementes desses acessos (exceto para o acesso 11), apresentaram atividade nematicida superior a 90% sobre a fase infectante (J2) desses nematoides. Resultados semelhantes foram encontrados por Dias e colaboradores (2000), que obtiveram extrato de *Artemisia absinthium* (losna) e *Artemisia verlotorum*, cujo efeito nematicida atestado foi superior a 90% para ambos os extratos, não sendo observada mobilidade dos nematoides após a recuperação em água. Korayem e colaboradores (1993) também observaram atividade nematicida de 100% para extrato de losna, após 72 horas de exposição.

A atividade registrada para cada ECA pode estar relacionada com a presença e concentração de alguns compostos químicos, presentes na amostra, cujo potencial ativo pode estar atuando isoladamente, ou em sinergismo com outros compostos. De acordo com a literatura, tem sido demonstrado efeito nematicida de subprodutos de espécies botânicas, como *Ricinus communis* L. (Gardiano, 2006), *Crotalaria juncea* L. (Amaral *et al.*, 2002; Inomoto *et al.*, 2006), *Chenopodium ambrosioides* L. (Melo *et al.*, 2006) e *Azadirachta indica* A. Juss. (Elbadri *et al.*, 2008; Javed *et al.*, 2008). Adicionalmente, existem muitos relatos da atividade de

extratos vegetais sobre nematoides, realizados em ensaios *in vitro* (Haseeb & Butool., 1996), como o extrato aquoso de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e *Crotalaria spectabilis* Roth. no controle de *M. incognita* (Rocha *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2013 a e b; Rocha *et al.*, 2017).

Já foram encontradas evidências de substâncias tóxicas aos nematoides em alguns órgãos das plantas (Salgado & Campos, 2003), inclusive algumas dessas substâncias já foram purificadas e caracterizadas. Estudo realizado por Wiratno e colaboradores (2009), demonstraram a potencialidade de extratos aquosos de diferentes partes das plantas como: broto, folha, rizoma, flor, semente, raiz, grãos, e caule, quanto ao potencial nematicida sobre *M. incognita*. Vale ressaltar ainda, que extratos obtidos com outros solventes também já tiveram sua ação avaliada sobre nematoides fitoparasitas, como por exemplo, extratos metanólicos. Dang e colaboradores (2011) avaliaram extratos metanólicos de sementes de *Annona squamosa* L., atestando sua eficiência para o controle de *Bursaphelenchus xylophilus* e *M. incognita*. Adicionalmente já foram identificadas algumas moléculas ativas em extratos metanólico para *M. incognita*, como metil-isotiocianato e o 2-tiofenicarboxaldeído, extraídos de *Capparis spinosa* L., e furfurool, presente em *Melia azedarach* L. (Caboni *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2013).

A atividade nematicida encontrada para os ECAs dos acessos de uma espécie de solanácea, pode estar relacionada à presença de metabolitos secundários como alcaloides, flavonoides, glicosídeos, entre outros (Silva *et al.*, 2003), ou mesmo a peptídeos menores (Almeida *et al.*, 2009). Como sugerido por Singh e colaboradores (2011), que encontraram atividade deletéria de extratos em folhas de *Calotropis posera* (L.) Dryand. sobre J2 de *M. incognita*, e inferiu que essa atividade poderia estar relacionada com a presença de metabólitos presentes nas plantas, como fontes de compostos nematicidas. Muitos desses compostos foram encontrados em plantas, ricas em alcaloides, diterpenos, ácidos graxos, glucosinolatos, isotiocianatos, fenóis, poliacetilenos, sesquiterpenos e tianil (Chitwood, 2002).

Para definir a dose mínima letal e a dose letal inibitória (DL₅₀), foi realizada curva de concentração com os ECAs ativos nematicidas provenientes de sementes dos acessos 48, 52 e 78 de uma espécie de planta da família Solanaceae, nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 µg. ml⁻¹. Observou-se que as dosagens desses ECAs estão diretamente relacionadas com a sua capacidade nematicida, onde a dosagem de 1000 µg. ml⁻¹, apresentou maior percentagem de nematoides mortos pós-tratamento. Khurma & Singh (1997), também testaram extratos de sementes em diferentes diluições, verificando redução gradativa da atividade nematicida proporcional à redução das concentrações dos extratos nos tratamentos. Adicionalmente, Ferreira (2018) utilizou ECAs radiculares de distintas espécies vegetais, e também confeccionou curva de

concentração, obtendo resultados semelhantes quanto à recuperação massiva dos J2 de *M. incognita* em baixas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g. ml}^{-1}$, corroborando quanto a atividade nematostática para essas concentrações. A DL_{50} do ECA da semente do acesso 48 foi de 108.2 μg , sendo essa concentração muito baixa se comparada aos resultados encontrados para os ECAs de sementes dos acessos 52 e 78, bem como para os DL_{50} inferidos por Ferreira (2018), sendo a menor concentração ativa encontrada no referido estudo de 336 $\mu\text{g. ml}^{-1}$.

A inferência da estabilidade térmica de qualquer composto com ação nematicida é uma importante característica física a ser definida, pois esses compostos ativos necessitam apresentar certa estabilidade quando submetidos às condições ambientais. Ferris & Zheng (1999), sugerem que os princípios ativos de origem vegetal podem ser sensíveis ao calor, entretanto Dias e colaboradores (2000) observaram aumento na atividade nematicida em extratos obtidos por infusão de *Tanacetum vulgare* L. e *Momordica charantia* L., inferindo que a quantidade dos compostos ativos presentes nessas plantas poderia ter aumentado com o aquecimento em água, o que justificaria a maior eficiência no controle de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Nesse sentido os bioensaios de viabilidade e recuperação foram realizados com os ECAs ativos de sementes dos acessos 48, 52 e 78, submetidos à temperatura mais alta do que a média inferida para as camadas de solo, onde se localizam os sistemas radiculares de diferentes culturas como soja, café, algodão, entre outras (Rosenzweig & Liverman, 1992;). Esses ECAs após submetidos à temperatura de 50 °C, não apresentaram perda na ação nematicida sobre J2 de *M. incognita*, com atividade de 100% para o extrato S48, 98% (S52) e 91% (S78). Esses resultados refletem a termoestabilidade dos compostos ativos presentes nesses ECAs, estando em concordância com os resultados obtidos por Rocha e colaboradores (2017), onde extrato de sementes de *Canavalia ensiformis* teve sua estabilidade térmica aferida sobre J2 de *M. incognita*, não apresentando redução na atividade nematicida após o tratamento térmico.

A reação a *Meloidogyne incognita*, dos acessos (11, 48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae utilizados para a obtenção dos ECAs de raízes e sementes, foram avaliadas. Adicionalmente contabilizou-se a quantidade da população total (ovos e J2) presentes nas raízes (NOJ2), número total de galhas (NG), número total de massas de ovos (NMO), quantidade de ovos e J2 por grama de raiz (NOJ2/GR), e o fator de reprodução (FR), inferindo-se a reação de resistência, suscetibilidade ou imunidade. Os acessos 48 e 52 tiveram reação considerada de resistência ($FR < 1$), sendo os demais acessos (11 e 78) suscetíveis ($FR > 1$). Adicionalmente, os acessos resistentes também apresentaram de maneira geral, quantidades menores de Total NOJ2, NMO e NOJ2/GR, tendo o acesso 48 se destacado também quanto ao

NG, sendo esses resultados compatíveis à reação de resistência em função de um menor FR. Estudos semelhantes foram realizados por Pinheiro e colaboradores (2014a, 2014b), onde avaliou-se a reação de acessos de diferentes espécies de solanáceas (*Solanum scuticum* L. e *Solanum stramonifolium* var *inermis* (Dunal) Whalen) a *M. enterolobii*. Nos dois trabalhos, foram relatados 21 acessos resistentes dessas duas espécies a *M. enterolobii* de um total de 43 acessos. Nesses estudos também foram utilizados índices para mensurar o NMO, IG e NOJ2/GR, sendo a reação de resistência compatível de maneira geral aos acessos que apresentaram os menores índices para essas variáveis. Adicionalmente, Pinheiro e colaboradores (2014b) também identificaram acessos resistentes a *M. enterolobii* em acessos de *Solanum paniculatum* L. e *S. subinermis* Jacq., patógeno este, não controlado pelo uso de cultivares portadores do gene Mi, que confere resistência à maioria das espécies de *Meloidogyne* em tomateiro (Gilbert & McGuire, 1956).

A avaliação da atividade citotóxica dos compostos ativos é um passo importante na caracterização biológica desses compostos bioativos, que podem servir como fonte para o desenvolvimento de novos produtos para aplicação na agricultura (Clardy & Walsh, 2004; Oksman-Caldentey & Inze, 2004). Os ECAs ativos oriundos de sementes dos acessos (48, 52 e 78) de uma espécie de planta da família Solanaceae, não apresentaram ação citotóxica significativa sobre hemácias bovinas, células do ovário de lagarta (*Spodoptera frugiperda*), e queratinócitos humanos (HaCat), com mais de 80% das hemácias bovinas viáveis após o tratamento, mesmo quando submetidas a altas concentrações desses extratos (1,5 mg). Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira (2018), em que ECAs radiculares de cinco espécies vegetais tiveram sua citotoxicidade aferida sobre hemácias bovinas, sendo que apenas um ECA apresentou atividade hemolítica de 85%, não havendo lise celular para os demais tratamentos. Observou-se ainda, que algumas concentrações menores como; 250 µg (ECA S48) e 100 µg (ECA S52) apresentaram maior proporção de lise celular do que concentrações superiores. Isso pode ser devido ao fato de que as próprias etapas dos procedimentos para a realização do bioensaio, podem influenciar na proporção de células lisadas ao final do processo, sendo relatados por alguns autores a ocorrência de hemólises em concentrados de hemácias devido a traumas mecânicos (MacDonald & Berg, 1959; Wilcox *et al.*, 1981; Thompson *et al.*, 1986), pois essas células são muito sensíveis a qualquer agitação, onde até mesmo o processo de homogeneização e pipetagem das amostras podem interferir na quantidade de células viáveis ao final do processo.

Ainda, não foi observada atividade citotóxica desses ECAs sobre células do ovário de *Spodoptera frugiperda* sendo a menor taxa de viabilidade celular registrada para o ECA S48, com 71% das células viáveis, após o tratamento. A maioria dos estudos utilizando extratos sobre essa espécie de lagarta verificam de maneira geral o efeito desses extratos sobre a viabilidade dos ovos, como o estudo realizado por Maroneze & Gallegos (2009), em que foi verificado o efeito não tóxico de extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* na viabilidade dos ovos dessa espécie de lagarta. Rocha e colaboradores (2017) avaliaram extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* na mortalidade larval de *S. frugiperda*, não tendo o extrato afetado as larvas, sendo o desenvolvimento larval normal.

No bioensaio de avaliação desses ECAs sobre queratinócitos humanos (HaCat), observou-se que o ECA S78 não apresentou citotoxicidade para as células em nenhuma das concentrações testadas, sendo a viabilidade dos queratinócitos para as concentrações de 125 µg/ml e 250 µg/ml as mais próximas do controle com água. O ECA S11 foi o de maior citotoxicidade dose dependente sobre esses queratinócitos para todas as concentrações (125, 250, 500 e 1000 µg.ml⁻¹), sendo registrada também, atividade citotóxica dose dependente para os ECAs S48 e S52, onde as concentrações de 125 e 250 µg.ml apresentaram maiores números de células viáveis, evidenciando que a atividade citotóxica foi reduzida proporcionalmente à redução das concentrações desses ECAs. Ombredane (2016), realizou bioensaios com extratos aquosos de *Curcuma longa* (açafrão) encapsulados em partículas de prata associados à quitosana sobre queratinócitos humanos (HaCat) por 24 horas. Nesse estudo, o extrato não apresentou citotoxicidade aos queratinócitos, sendo a viabilidade celular superior a 80% para todas as concentrações. Entretanto, vale ressaltar que no estudo em questão, a maior concentração utilizada foi de 80 µg pelo período de 24 horas, sendo essa concentração muito inferior se comparada às utilizadas no presente estudo, pelo período de 48 horas. Nesse sentido, infere-se que apesar da viabilidade celular ter sido em torno de 50% para o ECA S48 na concentração de 1000 µg.ml⁻¹, a viabilidade é satisfatória, considerando-se que foram utilizadas nessas células a mesma concentração dos bioensaio *in vitro* sobre *Meloidogyne* spp.

Os ECAs de sementes dos acessos 11, 48, 52 e 78 de uma espécie de Solanaceae, foram também avaliados quanto à fitotoxicidade sobre a germinação de soja (*Glycines max*) *in vitro* após 15 dias do cultivo. As plântulas tratadas com os ECAs apresentaram melhor desenvolvimento, maiores pesos fresco e seco das raízes e total, e medidas do colo ao ápice, superiores se comparado ao controle com água. Taiz & Zieger (2004) inferem que esse melhor desenvolvimento das plântulas tratadas com os ECAs vegetais, pode estar associado à presença

de importantes fitohormônios indutores do crescimento, como giberelinas, auxinas, citocininas e etileno. Estudo semelhante foi realizado por Corsato e colaboradores (2010), em que se avaliou o efeito alelopático de extratos aquosos de folha de girassol sobre a germinação de soja e picão-preto em casa de vegetação. Foi observada a inibição da germinação de soja convencional, nas aplicações de dosagens maiores de 100 % (200 g de extrato em 1 litro de água) e diluição de 80%. Vale salientar no estudo em questão, sobre o efeito da germinação que foi realizado em casa de vegetação com solo, o que justifica as concentrações utilizadas.

Segundo Moreira e colaboradores (2006) há uma concepção errônea de que os inseticidas botânicos serão sempre menos tóxicos ou mais seguros que os inseticidas sintéticos, porém há inseticidas botânicos registrados que são tóxicos a peixes, insetos e mamíferos. Por esse motivo, quanto mais específico para o alvo for o extrato, melhores serão os resultados obtidos. Corrêa & Salgado (2011) relatam que para a inserção definitiva e segura de produtos botânicos no mercado, são necessários estudos sobre o mecanismo de ação e a inferência da fitotoxicidade desses compostos, para a segurança de mamíferos e outros organismos. Assim, os ECAs ativos de sementes dos acessos (48, 52 e 78), de uma espécie de Solanaceae teve sua atividade avaliada sobre outros grupos de organismos não-alvos, não sendo aferida nenhuma inibição no desenvolvimento normal desses organismos.

Sobre a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78, não apresentaram formação de halo ao redor dos pontos onde foram aplicados os extratos, sendo o tapete bacteriano homogêneo quando comparado ao controle com água. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira (2018), onde extratos radiculares de diferentes espécies vegetais foram avaliados quanto à inibição da multiplicação normal de bactérias benéficas fixadoras de nitrogênio, *Azospirillum brasiliense* Tarrand *et al.*, 1978, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner 1896) Jordan 1982 e *B. diazoefficiens* Delamuta *et al.*, 2013. No presente estudo, os ECAs testados, também não apresentaram nenhuma inibição à multiplicação dessas bactérias, se comparado ao controle.

Bioensaios semelhantes foram realizados com *Trichoderma* (*T. asperellum* - CEN 162 e *T. harzianum* - CEN 267), sendo os ECAs de sementes desses acessos adicionados ao meio MS numa concentração 10 x superior ao utilizado nos bioensaios sobre *Meloidogyne* spp. Todas as placas apresentaram desenvolvimento normal desses fungos, resultando em placas tomadas pelos fungos cerca de 72 horas, pós-inoculação. Estudo realizado por Valadares-Inglis e colaboradores (2018), verificaram o crescimento de linhagens de *Trichoderma* spp. em meio contendo extrato de alho. Verificaram-se que uma linhagem de *T. harzianum* se destacou quanto ao bom

crescimento no meio contendo o extrato, enquanto outras linhagens de *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* e *T. tomentosum* foram completamente inibidas. Vale ressaltar, que nesse estudo foi aplicado somente $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na superfície do meio, sendo que para o presente estudo, a concentração adicionada ao meio foi 10 X superior ($10.000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), não apresentando nenhuma inibição desses ECAs no desenvolvimento das duas espécies de *Trichoderma*.

Bioensaios também foram realizados com levedura (*Candida maltosa* - CA 49), não sendo observado nenhuma inibição do crescimento normal dessa levedura do solo. Estudo realizado por Corrêa (2015), avaliou a atividade de extratos de plantas do Cerrado brasileiro em diferentes concentrações, sobre isolados clínicos de *Candida* spp. A atividade inibitória foi no geral caracterizada pela formação de halo de inibição, sendo a concentração máxima avaliada sobre esses isolados de *Candida* spp. de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a mesma concentração utilizada para este estudo. Naquele estudo, extratos de várias espécies vegetais apresentaram halo de inibição, mostrando-se tóxicas a esses isolados de leveduras, destacando entre eles, o extrato metanólico de *Erythroxylum daphnites* Mart., que não inibiu o desenvolvimento de nenhuma das cepas. Considerando que os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 neste estudo, não apresentaram formação de halo de inibição para a concentração avaliada, infere-se que o resultado obtido foi satisfatório, uma vez que a espécie utilizada no bioensaio é uma levedura benéfica do solo. Os bioensaios realizados neste estudo, demonstram a especificidade da ação desses ECAs ao nematoide *Meloidogyne* spp., não afetando o desenvolvimento de outros organismos.

Com o intuito de identificar as frações responsáveis pela ação nematicida, o ECA de sementes do acesso 48 de uma espécie de Solanaceae, foi selecionado e fracionado via HPLC-ME, onde as frações resultantes foram utilizadas em bioensaios sobre J2 de *M. incognita*. A fração 6 (Fr6), se destacou dentre as demais frações, com atividade nematicida concentrada superior a 99%, sendo esta fração novamente fracionada via HPLC-RP, onde as 17 frações resultantes tiveram suas massas inferidas via MALDI-TOF. A literatura é escassa quanto à seletividade de classes químicas para a obtenção de compostos com atividade nematicida. Entretanto, estudo semelhante foi realizado por Rocha e colaboradores (2017), ao purificar via HPLC-RP extrato aquoso de *Canavalia ensiformis*, sendo as frações resultantes testadas *in vitro* quanto à atividade nematicida sobre J2 de *M. incognita*, onde duas frações ativas foram selecionadas. Costa (2018), purificou compostos nematotóxicos obtidos por meio de processo de diálise em membrana de 3,5 kDa, de extrato aquoso de sementes de *Solanum stramonifolium*, e submeteu esse dialisado ativo ao fracionamento via HPLC. As frações obtidas foram separadas

em 4 grupos (F1-4), e avaliadas quanto à atividade nematicida sobre J2 de *M. incognita*, onde o F4 apresentou 100% de mortalidade pós-recuperação.

Apesar das massas moleculares presentes nas frações ativas terem sido inferidas neste trabalho, ressalta-se que ainda não foi possível identificar com precisão as classes químicas responsáveis pela atividade nematicida demonstrada, sendo necessários passos adicionais para a completa caracterização dos grupamentos ativos. Entretanto, sabe-se que já foram identificadas plantas da família Solanaceae com resistência natural à infecção por nematoides (Matos *et al.*, 2011), onde a literatura relata a riqueza dessa família (como no gênero *Solanum*), em compostos químicos diversos, como alcaloides e flavonoides, que podem estar associados à atividade nematotóxica encontrada em espécies dessa família. A exemplo, diversos alcaloides esteroidais como: jurubebina, jubebina e solanina; bem como algumas saponinas: isojuripidina, isojurubidina, e isopaniculina, já foram isoladas de *S. paniculatum* (Mesiavela *et al.*, 2002), onde Helmja e colaboradores (2007) inferem ainda sobre a identificação de vários compostos fenólicos em Solanaceae, como: rutina, naringenina, ácido clorogênico e ácido caféico.

As sementes são consideradas ricas em compostos químicos, que podem ser eficazes para o controle de fitonematoides (Almeida *et al.*, 2009; Caboni *et al.*, 2014; Naz *et al.*, 2013), visto que plantas possuem mecanismos de defesa sofisticados, com a maior concentração desses mecanismos presentes nas suas sementes, pois essas sementes são seus veículos de propagação e sobrevivência das espécies, onde seus tecidos acumulam uma vasta gama de compostos defensivos que conferem resistência contra predadores fitófagos, infecção por bactérias, vírus, fungos e nematoides (Bowles, 1990; Ryan, 1990; Chrispeels & Raikhel, 1991; Barbieri, 1993; Peumans & Van Damme, 1995; Koiwa *et al.*, 1997).

7.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 de uma espécie de planta pertencente à família Solanaceae, apresentaram atividade nematicida superior a 90% sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* na concentração de 1000 $\mu\text{g. ml}^{-1}$, após 48 horas de exposição.

Os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 mantiveram a mesma atividade nematicida, após tratamento térmico a 50 °C por 24 horas. Ainda, os ECAs de sementes desses acessos apresentaram dose letal média de 108 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (S48), 698.8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (S52), e entre 612.3 - 745.2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (S78).

Os acessos 48 e 52 tiveram reação de resistência a *M. incognita* com $\text{FR}<1$, enquanto os acessos 11 e 78 foram suscetíveis com $\text{FR}>1$.

Hemácias bovinas tratadas como os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 apresentaram viabilidade superior a 80% para todas as concentrações testadas, enquanto a viabilidade das células do ovário de *Spodoptera frugiperda* foi superior a 70% para os ECAs de sementes desses acessos, na concentração de 1000 $\mu\text{g. ml}^{-1}$.

No caso de queratinócitos de humanos (HaCat) submetidos aos ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 foi observada uma viabilidade celular superior a 50% para a concentração de 1000 $\mu\text{g. ml}^{-1}$, com aumento da viabilidade proporcional à diminuição das concentrações desses extratos. O ECA S78 nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ exibiram baixa citotoxicidade para essas células, com resultados semelhantes ao do controle com água.

Os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 não foram fitotóxicos para a germinação de sementes de soja (*Glycines max*), não ibiram o crescimento da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, nem ao crescimento micelial de *Trichoderma asperelum* e *T. harzianum*, e da levedura *Candida maltosa*.

Entre as frações cromatográficas obtidas via HPLC-ME do ECA de sementes do acesso 48, a fração com maior ação nematicida foi a Fr6, sendo essa fração selecionada e purificada via HPLC-RP, com as massas moleculares das frações resultantes mensuradas via MALDI-TOF para dar continuidade aos estudos de caracterização de compostos responsáveis pela ação nematicida.

Os resultados gerados, evidenciam a potencialidade nematicida de ECAs e frações oriundas de sementes de acessos de uma espécie de planta da família Solanaceae sobre *Meloidogyne* spp., e proporciona novas perspectivas para o controle destes fitopatógenos, que estão entre os fitonematoides mais importantes para a agricultura no Brasil e no mundo.

8.PERSPECTIVAS

A seguir estão listadas as atividades científicas que poderão ser executadas, visando a continuidade dos estudos do uso dos ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 com vistas ao manejo sustentável dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.).

- 1.Realizar ensaios com os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78 em casa de vegetação, para certificar a eficiência desses extratos no controle de *Meloidogyne* spp. *in vivo*.
- 2.Realizar ensaio de reinoculação dos nematoides tratados com os ECAs de sementes dos acessos 48, 52 e 78, tendo plantas suscetíveis de *Nicotiana tabacum* como padrão de suscetibilidade a *M. incognita*.
- 3.Realizar estudos complementares com as plantas (clones) que apresentaram reação de resistência a *Meloidogyne* spp.
- 4.Realizar ensaios de viabilidade e recuperação *in vitro* com as frações resultantes da purificação da fração 6 (Fr6) nematicida obtidas via HPLC-RP para seleção das frações ativas.
- 5.Realizar ensaio comparativo em casa de vetação entre os ECA's ativos e os principais nematicidas disponíveis no mercado.
- 6.Identificar via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa das classes químicas e consequentemente, o (os) composto (os) químicos das frações ativas responsáveis pela atividade nematicida.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; FAVERY, B.; MARIE-NOËLLE ROSSO, M-N & CASTAGNONE-SERENO, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4:217-224

ABAD, P.; GOUZY J.; AURY, J. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V. C.; CAILLAUD, M. C.; COUTINHO, P. M.; DASILVA, C.; DE LUCA, F.; DEAU, F.; ESQUIBET, M.; FLUTRE, T.; GOLDSTONE, J. V.; HAMAMOUCHE, N.; HEWEZI, T.; JAILLON, O.; JUBIN, C.; LEONETTI, P.; MAGLIANO, M.; MAIER, T. R.; MARKOV, G. V.; MCVEIGH, P.; PESOLE, G.; POULAIN, J.; ROBINSON-RECHAVI, M.; SALLET, E.; SÉGURENS, B.; STEINBACH, D.; TYTGAT, T.; UGARTE, E.; GHELDER, C. V.; VERONICO, P.; BAUM, T. J.; BLAXTER, M.; BLEVE-ZACHEO, T.; DAVIS, E. L.; EWBANK, J. J.; FAVERY, B.; GRENIER, E.; HENRISSAT, B.; JONES, J. T.; LAUDET, V.; MAULE, A. G.; QUESNEVILLE, H.; ROSSO, M.; SCHIEX, T.; SMANT, G.; WEISSENBACH, J & WINCKER, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26: 909-915.

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, JEAN-MARC.; CASTAGNONE SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J.; DELEURY, E.; PERFUS BARBEOCH, L.; ANTHOURAD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V. C.; CAILLAUD, MARIE-ABAD, P. & WILLIAMSON, V. M. 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research* 53: 147-192.

ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N.M & SALEH, M.A. 2013. Nematicidal activity of terpenoids. *J Environ Sci Health B* 48: 16-22.

AHMAD, F., SIDDIQUI, M. A., & BABALOLA, O. O. 2013. Characterization of nematicidal activity of plant residues and their application with moisture approach against *Meloidogyne incognita* in tomato. *Afr J Agric Res*, 8: 93 -101.

ABRASCO. 2019. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Disponível em: http://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2019_web.pdf Consultado em 20/10/ 2019.

ADEGBITE, A. A. 2011. Effects of some indigenous plant extracts as inhibitors of egg hatch in root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* race 2). *American Journal of Experimental Agriculture* 3:96-100.

AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5^a ed. Academic Press. Amsterdam.

ALMANÇA, M.A.K. 2005. *Trichoderma* sp. no controle de doenças e na promoção do crescimento de plantas de arroz. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

ALMEIDA, E.J., SANTOS, J.M & MARTINS, A.B.G. 2009. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:421-423.

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P & CARVALHO, D.A. 2002. Efeitos de

alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Nematologia Brasileira* 26: 43-48.

ANVISA. 2018. Registro de Agrotóxicos - Anvisa. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registro> Consultado em 04/01/2019.

ANWAR, S.A. & MCKENRY, M.V. 2012. Incidence and population density of plant-parasitic nematodes infecting vegetable crops and associated yield losses in Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* 44: 327-333.

ASMUS, G.L. 2001. Danos causados à cultura da soja por nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L.C.C.B.; ASMUS, G.L.; CARNEIRO, R.G.; MAZAFFERA, P. & SILVA, J.F.V. (Eds.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Embrapa Soja. Londrina. p. 39-62.

BAERMANN, G. 1917. Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben. *Geneeskd Tijdschr Ned Indie* 57: 131-137.

BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.; ATKINON, H.J. & MCPHERSON, M.J. 2005. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interact* 10: 1099-106.

BAKHETIA, M., URWIN, P.E & ATKINSON, H.J. 2008. Characterization by RNAi of pioneer genes expressed in the dorsal pharyngeal gland cell of *Heterodera glycines* and the effects of combinatorial RNAi. *International Journal for Parasitology* 38: 1589-1597.

BARBIERI, V. 1993. Condicionamento climático da produtividade potencial da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.): um modelo matemático-fisiológico de estimativa. Tese de doutorado. USP/ESALQ. Piracicaba, Brasil.

BARBOSA, L.C.; BARCELOS, F.F.; DEMUNER, A.J. & SANTOS, M.A. 1999. Investigation-Research: chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. *Nematropica* 29: 81-88.

BARKER, K.R. & KOENNING, S.R. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review Phytopathology* 36: 165-205.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. 1995. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Agronômica Ceres. 3ª ed. São Paulo.

BERGAMIN FILHO, A. 2002. Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos. Annablume. São Paulo.

BERGAMIN FILHO, A.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. & MENÊZES, J.E. 2008. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 226. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília.

BLAXTER, M.L. 2003. Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Adv Parasitology* 54: 101-195.

BLAXTER, M. & KOUTSOVOULOS, G. 2015. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology* 142: 26-39.

BLAXTER, M.L.; DE LEY, P.; GAREY, J.R.; LIU, L.X.; SHELDAMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J.R.; MACKEY, L.Y.; DORRIS, M. & FRISSE, L. M. 1998. The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. *Nature* 392:71-5.

BONETTI, J.I.S & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6: 553-553.

BOWLES, D. J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.

BRASIL. 1989. Lei Federal n. 7.802 de 11 de julho 1989. Disponível em <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/616627.pdf>>. Consultado em 25/07/2018.

BRASIL. 2002. Decreto N° 4.074 de 04 de janeiro de 2002. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos>. Consultado em 13/09/2018.

BRASIL. 2018 Revisão da legislação brasileira de agrotóxicos. <http://www.agricultura.gov.br/noticias/revisao-da-legislacao-brasileira-de-agrotoxicos>. Consultado em 05/06/2018.

BRASS, F.E.B.; VERONEZZE, N.C. & PACHECO, E. 2008. Aspectos biológicos do *Meloidogyne* spp. relevantes a cultura do café. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia* 7: 14: 7.

BREMER, K., FRIIS, E. & BREMER, B. 2004. Molecular phylogenetic dating of asterid flowering plants shows early Cretaceous diversification. *Systematic Biology* 53: 496-505.

CABONI, P. & NTALLI, N. 2014. Botanical nematicides, recent findings. In: (Ed.). *Biopesticides: state of the art and future opportunities*: ACS Publications, p.145-157. ISBN 1947-5918.

CAILLAUD, MARIE-CÉCILE.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECONTE, P.; ENGLER, J.A.; ROSSO, MARIE-NOELLE.; FAVERY, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165:104-113.

CAMPOS, V. P. 1992. Implicação da sobrevivência dos nematoides em solos e raízes de plantas no controle dos fitopatógenos. *Informe Agropecuário* 16:15-16.

CARES, J.E.; BLUM, E.B. & EDNALVA, P.A. 2012. Nematologia vegetal: uma introdução. *In:*

BLUM, L.E.; CARES, J.R.; UESUGI, C.H (Eds). Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas. 1ª ed. Otimismo. Brasília. p. 116-136.

CASTAGNONE-SERENO, P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96:282-289.

CEPULITÉ, R.; DANQUAH, W.B.; BRUENING, J. & WILLIAMSON, V. 2018. Potente attractant root-knot nematodes in exudates from seedling root tips of two host species. *Scientific Reports* 8:10847.

CHAVES, A.; PEDROSA, E.M.R.; COELHO, R.S.B.; GUIMARÃES, L.M.P; MARANHÃO, S.R.V.L. & GAMA, M.A.S. 2012. Alternativa para o manejo integrado de fitonematoides em cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 7: 73-80.

CHECON, J.T. 2011. Atividade anti-inflamatória do extrato liofilizado de *Physalis angulata* L. em cultura de queratinócitos humanos e seu potencial como ativo dermocosmético. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

CHITWOOD, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual review of Phytopathology* 40: 221-249.

CHRISPEELS, M.J., & RAIKHEL, N.V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell* 3:1-9.

CLARDY, J. & WALSH, C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 829-37.

CNA. 2018. O Futuro é agro 2018-2030. https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/plano_de_estado_completo_21x28cm_web.pdf. Consultado em 05/11/2018.

COBB, N.A. 1893. Nematodes, mostly Australian and Fijian. *Macleay Mem. Linn. Soc. NS.W.* p.252-308.

COIMBRA, J.L. & CAMPOS, V.P. 2005. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 232-238.

CONAB. 2019. Observatório Agrícola - acompanhamento da safra brasileira de grãos, v.6, n. 2, safra 2018/2019, ISSN 2318-6852. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Consultado em 26/01/2019.

COOLEN, W. A. & D'HERDE, C.J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Nematology Reserch Station. Belgium.

CORDEIRO, M.J.Z.; MATOS, A.P. & KIMATI, H. 2005. Doenças da bananeira. *In*: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. (Eds.). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. Agronômica Ceres. São Paulo. p.99-117.

CORDEIRO, Z. J. M. Doenças da bananeira. 1999. *In*: ZAMBOLIM, L & MONTEIRO, A.J.A. (Eds.). 3º Encontro de Fitopatologia: Doenças em fruteiras tropicais. Imprensa Universitária. Viçosa. p.145-182.

CORRÊA, J.A.M. 2015. Estudo químico de extratos de plantas da Família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil.

CORRÊA, J.C.R & SALGADO, H.R.N. 2011. Atividade de inseticida das plantas e aplicação: revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13: 500-506.

CORSATO, J.M.; FORTES, A.M.T.; SANTORUM, M. & LESZCZYNSKI, R. 2010. Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de girassol sobre a germinação de soja e picão-preto. *Ciências Agrárias* 31: 353-360.

COSTA, M.J.N., S.; OLIVEIRA, S.; COELHO, S.J & CAMPOS, V.P. 2001. Nematoides em plantas ornamentais. *Ciência e Agrotecnologia* 25: 1127-1132.

COSTA, T.G. 2018. Potencial biotecnológico de aleloquímicos de *Solanum stramonifolium* Jacq. No controle de fitonematóides. Tese de doutorado. Universidade Católica de Brasília. Brasília, Brasil.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M & LEWIS, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. *In*: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; & JONES, R. (Eds.). American Society of Plant Physiologists. Rockville. p. 1250-1311.

CRUZ, J.C.S. & SILVA, M.A. 2006. Solarização de solos, uma opção para o manejo de culturas na agricultura familiar. *Pesquisa & Tecnologia* 3: 1.

DANG, Q. L.; KIM, W. K.; NGUYEN, C. M.; CHOI, G. J.; JANG, K. S. & KIM, J. C. 2011. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 11160-11167.

SILVA, T.M.S.; DE CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. & DE FATIMA, A., M. 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova* 26:517-522.

DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S & BAUM, T.J. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20: 134-141.

DE LEY, P. & BLAXTER, M. I. 2002. Systematic position and phylogeny. *The Biology of Nematodes*. London. Taylor & Francis, p. 1-30.

DE WAELE, D. & ELSSEN, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology* 45:457-485.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. *In*: DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. UNESP. São Paulo. p.9-14, 1996.

DIAS, C.R.; SCHWAN, A.V.; EZEQUIEL, D.P.; SARMENTO, M.C & FERRAZ, S. 2000. Efeito extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira 24: 219-226.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. 2001. Nature 411: 843-847.

DOBSON, C.M. 2004. Chemical space and biology. Nature 432: 824-828.

DONG, L.Q & ZHANG, K.Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil 288: 31-45.

DROPKIN, V.H. 1980. Introduction to Plant Nematology. John Wiley and Sons, New York. 216.

DUFOUR, R.; GUERRERA, M. & EARLES, R. 2003. Appropriate technology transfer for rural areas. alternative nematode control. <http://www.fao.org/docrep/V9978E/v9978e08.htm#TopOfPage>. Consultado em 25/10/2018.

DURBIN, M.L.; MCCAIG, B. & CLEGG, M.T. 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. Plant Molecular Biology 42: 79-92.

DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P. ROCHA, F.S.; SILVA, J.R.C. & POZZA, E.A. 2006. Manejo do solo e da irrigação no controle de *Meloidogyne incognita* em cultivo protegido. Fitopatologia Brasileira 31: 405-407.

EC. 2013. Pesticides. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index_en.htm. Consultado em 03/10/19.

ECb. 2013a. European Commission. Available online. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index_en.htm. Consultado em 03/10/2018.

EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W.R. (Ed.). Manual of Agricultural Nematology, Marcel Dekker, New York. p. 191-274.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J. & TRIANTAPHYLLOU, A. C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes [*Meloidogyne* species] with a pictorial key. Departments of Plant Patology and Genetics. North Carolina State University.

ELBADRI, G.A.; LEE, D.W.; PARK, J.C.; YU, H.B & CHOO, H.Y. 2008. Evaluation of various plant extracts for their nematicidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. Journal of Asia-Pacific Entomology 11:99-102.

EMBRAPA SOJA. 2002. Tecnologias de produção de soja. Paraná, Londrina.

FAO & WHO. 2016. International Code of Conduct on Pesticide Management Guidelines on Highly Hazardous Pesticides. www.fao.org/publications. Consultado em 15/ 05/2019.

FAO. 2017a. Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects. Plant nematode

problems and their control in the Near East region. <http://www.fao.org/3/v9978e/v9978e08.htm> . Consultado em 11/08/2018

FAO. 2017b. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>. Consultado em 12/07/2018.

FERRAZ, L.C.C.B. & BROWN, D.J.F. 2016. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Norma Editora, Manaus–AM.

FERRAZ, S. & FREITAS, L.G. 2004. Use of antagonistic plants and natural products. *Nematology- Advances and Perspectives* 2: 931-977.

FERRAZ, S. & FREITAS, L.G. 2008. O controle de fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais. <http://www.ifc-camboriu.edu.br/~wilson/LPPO-Agroecologia/Artigocontroladenematoidespor%20plantas.pdf>. Consultado em 13/05/2018.

FERRAZ, S. & SANTOS, M.A. 1995. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 3:283-314.

FERREIRA, A.A. 2018. Extratos aquosos radiculares de plantas da família Solanaceae exibindo atividade nematotóxica no controle de *Meloidogyne incognita*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.

FERRIS, H. & ZHENG, L. 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 31:241-263.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C. F.; ALMANÇA, M.A.K. & TEDESCO, S.B. 2007. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. *Revista Árvore* 31: 221-228.

FREIRE, F.C.O. & CARDOSO, J.E. 1996. Ocorrência de nematoides das galhas em aceroleira. Comunicado 10. Embrapa-CNPAT. Fortaleza.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L. & FERRAZ, S. 2001. Introdução a Nematologia. Editora UFV. Viçosa.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R.D.L & FERRAZ, S. 2004. Introdução à Nematologia. 1ª ed. Editora UFV. Viçosa. 2004.

GARCÍA, A.A. & CARRIL, P.-U., E. 2009. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca* 2: 119-145.

GARDIANO, C.G. 2006. A atividade nematicida de extratos aquosos e tinturas vegetais sobre *Meloidogyne javanica* (Treub,1885) Chitwood, 1949. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil.

GASPARIN, D.C.C. 2005. Defensivos agrícolas e seus impactos sobre o meio ambiente. Monografia. PUC. Curitiba, Brasil.

- GENTZ, M.C.; MURDOCH, G. & KING, G.F. 2010. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biological Control* 5: 208-215.
- GHEYSEN, G. & FENOLL, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40: 191-219.
- GILBERT, J.C. & MCGUIRE, D. C. 1956. Inheritance of resistance to severe root-knot from *M. incognita* in commercial-type tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 68: 437-442.
- GOMMERS, F.J. 1981. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. *In: Helminthological Abstracts* 50: 9-24.
- GONÇALVES, F.M.A. 2004. Agrotóxicos: o controle da saúde dos trabalhadores expostos. Curso do "Congresso ANAMT". Goiânia, GO.
- GONÇALVES, A.P.P.; VIEIRA, G.D.; CUNHA, P.N.A.; KISSLER, T.V.L.; HERNÁNDEZ, A.H.F. & TELES, C.B.G. 2016. Caracterização fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos de *Solanum subinerme* (Solanaceae). *Revista Brasileira Pesquisa e Saúde* 8: 8-16.
- HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J.T., & GHEYSEN, G. 2012. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* 492: 19-31.
- HASEEB, A. & BUTOOL, F. 1996. Evaluation of nematocidal properties of some members of the Family Solanaceae. *Comunicação Científica. Bioresouce Technology* 57:95-97.
- HAWKES, J.G. 1999. The economic importance of the family Solanaceae. *In: NEE, M.; SYMON, D.E.; LESTER, R.N. & JESSOP, J.P. (Eds.). Solanaceae IV. Advances in Biology & Utilization. Royal Botanic Garden, London, p.1-8.*
- HELMJA, H.; VAHER, M.; GORBATSOVA, J. & KALJURANJ, M. 2007. Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 56:172-186.
- HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. & BISSETT, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51:409-416.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J & HUSSEY, R.S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:14302-14306.
- HUANG, S.P. & PORTO, M.V.F. 1988. Efeito do alqueive na população dos nematoides-das-galhas e na produção de cenoura. *Fitopatologia Brasileira* 13: 377-381.
- HUSSEY, R.S & WILLIAMSON, V.M. 1998. Physiological and molecular aspects of nematode

parasitism. *Plant and Nematode Interactions* 36: 87-108.

HUSSEY, R.S & BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.

INOMOTO, M.M.; MOTTA, L.C.C.; BELUTI, D.B. & MACHADO, A.C.Z. 2006. Reação de seis adubos verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. *Nematologia Brasileira* 30: 39-44.

ISMAN, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19:603-8.

JAMMES, F.; LECOMTE, P.; ALMEIDA-ENGLER, J.; BITTON, F.; MARTÍN-MAGNIETTE, M.L.; RENO, J.P.; ABAD, P. & FAVERY, B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44: 447-458.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A. & QUEIROZ, S.C.N. 2009. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental global-um enfoque às maçãs. *Química Nova* 32: 996-1012.

JAVED, N.; SAFDA, A.; ANWAR, S. A; SHHINA, F. M. N.; KHAN, M & ASHFAQ, M. 2008. Effects of neem formulations applied as soil drenching on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on roots of tomato. *Pakistan Journal of Botany* 40: 905-910.

JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48: 692.

JONES, J.T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E.G.; GAUR, H.S.; HELDER, J.; JONES, M.G.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J.E.; WESEMAEL, W.M. & PERRY, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14: 946-961.

JYOTSNA, A.S.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, R.P.; SRIVASTAVA, A.K.; SAXENA, A.K. & ARORA, D.K. 2008. Growth promotion and charcoal rot management in chickpea by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Protection Research* 48:81-91.

KARABELAS, A. J.; PLAKAS, K. V.; SOLOMOU, E. S.; DROSSOU, V. & SARIGIANNIS, D. A. 2009. Impact of European legislation on marketed pesticides — a view from the standpoint of health impact assessment studies. *Environment international* 35: 1096-1107.

KARSSSEN, G. & MOENS, M. 2006. Taxonomy and principal general root-knot nematodes. *In*: PERRY, R.L. & MOENS, M. (Eds.). *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford, UK. p. 60-90.

KHAN, Z. & KIM, Y.H. 2007. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology* 35:370-379.

KHURMA, U.R. & SINGH, A. 1997. Nematicidal potential of seed extracts: in vitro effects on

juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Nematologia Mediterranea* 25:49-54.

KIM, S-II.; KIM, J.Y R.; LEE HAN, S. & AHN, Y. J. 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research* 39: 293-303.

KOIWA, H.; SHADE, R.E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.; MURDOCK, L.L.; NIELSEN, S.S.; BRESSAN, R.A. & HASEGAWA, P.M. 1997. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant Journal* 14: 371–379.

KORAYEM, A. M.; HASABO, S. A. & AMEEN, H. H. 1993. Effects and mode of action of some plant extracts on certain plant parasitic nematodes. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 66: 32-36.

Li, W.; SUN, Y.N.; YAN, X.T.; YANG, S.Y.; LEE, S.J.; BYUN, H.J.; MOON, C.S.; HAN, B.S & KIM, Y.H. 2013. Isolation of nematocidal triterpenoid saponins from *Pulsatilla koreana* root and their activities against *Meloidogyne incognita*. *Molecules* 18:5306-16.

LIN, C., MUELLER, L. A., MC CARTHY, J., CROUZILLAT, D., PETIARD, V & TANKSLEY, S. D. 2005. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theoretical and applied genetics*, 112: 114 -130.

LINDSEY O.L & CLAYSHULTE M.S. 1982. Influence of initial inoculum densities of *Meloidogyne incognita* on three chile cultivars. *Journal of Nematology* 14: 353:358.

LORDELLO, L.G.E. 1976. Perdas causadas por nematoides. *Revista de Agricultura* 51: 222.

LORDELLO, L G.E. 1984. Métodos gerais de controle. *In: LORDELLO, L.G.E. Nematoides das Plantas Cultivadas*. Nobel. São Paulo. p.81-123.

MACDONALD, W.B & BERG, R.B. 1959. Hemolysis of transfused cells during use of the injection (push) technique for blood transfusion. *Pediatrics* 23:8-11.

MACHADO, D.F.M.; PARZIANELLO, F.R.; DILVA, A.C.F. & ANTONIOLLI, A.I. 2012. *Trichoderma* no Brasil: O fungo bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 35: 274-288.

MACIEL, S.L. & FERRAZ, L.C.C.B. 1996. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. *Scientia Agricola* 53:232-236.

MARONEZE, D.M.; GALLEGOS, D.M.N. 2009. Efeito de extrato aquoso de *Melia azedarach* no desenvolvimento das fases imatura e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Semina: Ciências Agrárias* 30: 537-549.

MARQUES, L.C. 2005. Preparação de extratos vegetais. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina* 3: 74-76.

MARTINS, P.R. 2000. Trajetórias tecnológicas e meio ambiente: A indústria de agroquímicos/transgênicos no Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Filosofia e Ciências

Humanas/Unicamp. Campinas.

MARZZOCO, A. & TORRES, B.B. 2007. Bioquímica Básica. 3ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 736p.

MATOS, N.C.; SCACHETI, L.F.; MALLAFATI, L.; & NAVARRO, F.F. 2011. Controle de qualidade e análise sensorial em voluntários de xampu esfoliante com extrato hidroalcoólico de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 32: 369-374.

MCLAREN, J.S. 1986. Biologically active substances from higher plants: status and future potential. Pestic. Sci. 17: 559-78.

MELO, I.S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. *In*: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.). Controle Biológico 1 :17-60.

MENEZES, E.L.A. 2005. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Embrapa Agrobiologia. Seropédica.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de População Expostas a Agrotóxicos. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.>>. Acesso em: 20 out. 2018.

MITCHUM M.G.; WANG, X.; WANG, J. & DAVIS, E.L. 2012. Role of nematode peptides and other small molecules in plant parasitism. Annual Review of Phytopathology 50:175–195.

MITKOWSKI, N.A. & ABAWI, G.S. 2003. Nematóides das galhas. Português traduzido por E.A. LOPES, R. DALLEMOLE-GIARETTA & B.S. VIEIRA, 2011. The Plant Health Instructor.

MOENS, M.; PERRY, R.N. & STARR, J.L. 2009. *Meloidogyne* species a diverse group of novel and important plant parasites. *In*: PERRY, R.N.; MOENS, M. & STARR, J.L. (Eds.). Root-knot nematodes, CAB International, Wallingford, U.K. p. 1-17.

MONTEIRO, A.R., DE OLIVEIRA, C.M.G.; FERRAZ, L.C.C.B. & GONÇALVES, W. 1995. Identificação morfológica de populações de *Meloidogyne* de cafezais paulistas. 1995. *In*: Anais do ANAIS DO CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA. Rio Quente, GO. Sociedade Brasileira de Nematologia. SBN/Organizacao dos Nematologistas da America Tropical. Rio Quente, GO. p. 149-153.

MOREIRA, A.D.C. 2017. Composição e estrutura da infracomunidade de metazoários parasitas da sardinha-papuda *Triportheus angulatus* (Spix e Agassiz, 1829) do lago Catalão, rio Solimões, Amazônia Brasileira. Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, Brasil.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; SILVA, E.D.; MORENO, S.C. & MARTINS, J.C. 2006. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. *In*: ALVARES, L.; ANDRADE, L.M. Controle alternativo de pragas e doenças. UFV. Viçosa. p. 89-120.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T. & PEREIRA, N.A. 2000. Medicinal plants of Brazil. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan.

MOURA, R.M. 1996. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4:209-244.

MOURA, V.M. & SCHLICHTING, C.L.R. 2007. Alcalóides, piretróides e rotenóides: inseticidas naturais como uma alternativa ecológica sustentável. Revista Uningá 13:37-44.

MURASHIGIE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tiddu cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.

NASS, L.L. 2007. Recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia. Brasília.

NAZ, I.; PALOMARES-RIUS, J.E.; SAIFULLAH, V.B.; KHAN, M.R.; ALI, S. & ALI, S. 2013. *In vitro* and in planta nematicidal activity of *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) against the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Pathology 62: 943- 952.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M & SNADER, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. Journal of Natural Products 66:1022-1037.

OERKE, E.C. 1994. Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. *In*: OERKE, E.C.; DEHNE, H.W.; SCHONBECK, F. & WEBER, A. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier. Amsterdam.

OERKE, E.C. 1999a. The importance of disease control in modern plant production. Mod. Fungicides Antifungal Compd. II, p. 11-17.

OERKE, M. 1999b. Ad-hoc-Mitteilungen und deutscher Aktienmarkt: Marktreaktion auf Informationen. Gabler, Wiesbaden, Germany.

OKSMAN-CALDENTY, K.M. & INZE, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science 9: 433-40.

OLIVEIRA, L.M.; BEVILAQUA, C.M.; MACEDO I.T.; MORAIS, S.M.; MONTEIRO, M.V.; CAMPELLO, C.C.; RIBEIRO, W.L. & BATISTA, E K. 2011. Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20:155-60.

OMBREDANE, A.S. 2016. Síntese verde de nanopartículas de prata de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em câncer de pele não melanoma linhagem (A431). Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.

ONU. World Population Prospects. 2019. Consultado em 22/06/2018. > <https://population.un.org/wpp/><

OPPERMAN, C.H.; BIRD, D.M.; WILLIAMSON, V.M.; ROKHSAR, D.S.; BURKE, M.; COHN, J., CROMER, J.; DIENER, S.; GAJAN, J.; GRAHAM, D.; HOUFEK, T.D.; LIU, Q.; MITROS, T.; SCHAFF, J.; SCHAFFER, R.; SCHOLL, E.; SOSINSKI, B.R.; THOMAS, V.P. &

- WINDHAM, E. 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 14802-14807.
- ORION, D. & KRITZMAN, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* matrix. Revenue de Nematologie 14:481-483.
- OSLEN, M.W. 2000. Root-knot nematode. University of Arizona. Arizona Cooperative Extension. Tucson, AZ, USA.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Resumo publicado pela Societé de Nématologistes Européens. Comptes Rendus du Huitième Symposium International de Nématologie.
- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A. & MOITY, T.H.A. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology 72: 126-132.
- PASCUAL – VILA LOBOS, M.J. 1996. Plaguicidas naturais de origen vegetal: estado actual de la investigación. Monografía. Instituto Nacional de Investigación Agrária y Alimentaria, Madri, España.
- PEREIRA, R.B.; PINHEIRO, J.B.; DE MENDONÇA, J.L.; GUIMARÃES, J.A. & LUCAS, G.C. 2018. Evaluation of resistance of *Solanum scuticum* accessions to soil-borne pathogens in tomato crops in Brazil. Acta Horticulturae 1207:55-62.
- PERES, F.; SILVA, O.; JOSÉ, J.; VICENTE, H.; DELLA-ROSA, H. V & LUCCA, S.R. 2005. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva 10:27-37.
- PERINA, F.J.; COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; CHITARRA, L.G.; BOGIANI, J. C.; LAMAS, F.M. & CARNEIRO, R.M.D. 2015. Manejo de fitonematoides na cultura do algodoeiro. Comunicado Técnico EMBRAPA Algodão. Campina Grande-PB.
- PERRY, R.N.; MOENS, M. & STARR, J.L. 2009. Root-knot nematodes. In: EISENBACK, J.D. & HUNT, D.J.(Eds.). General morphology. CABI International, Virgínia, USA. p.18-54.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J. 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiology 109: 347-352.
- PINHEIRO, J. B.; MENDONÇA, J. L. M.; RODRIGUES, C.S.; PEREIRA, R.B & SUINAGA, F.A. 2014a. Reação de *Solanum scuticum* a *M. enterolobii*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 106. Embrapa Hortaliças. Brasília.
- PINHEIRO, J.B.; MENDONCA, J L.; RODRIGUES, C.S.; PEREIRA, R.B. & SUINAGA, F.A. 2014b. Avaliação de *Solanum stramonifolium* para reação a *Meloidogyne enterolobii*. Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília, Distrito Federal.

PINTO, F.D.C.L.; UCHOA, D.E.D.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F.M. & ESPINDOLA, L.S. 2011. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. Química Nova 34: 284-288.

PUTHOFF, D.P.; NETTLETON, D.; RODERMEL, S.R. & BAUM, T. J 2003. *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. The Plant Journal 33: 911-921.

QAMAR, F.Z.; KAPADIA, S.A.; KHAN, S. A & BADAR, Y. 1995. *Datura metel* L., a plant with nematicidal potential. Pak. J. Sci. Ind. Res 38: 319-321.

RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; PINHO, R.G.V & VIEIRA, A.R. 2004. Inoculações de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. Ciência e Agrotecnologia 4: 793-798.

REZENDE, F.M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F.A. & CARVALHO, W.R.S. 2016. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: VI BOTÂNICA NO INVERNO 2016. São Paulo, 04 a 22 de julho. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. p. 1-28.

RIBAS, P. P. & MATSUMURA, A.T.S. 2009. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e o meio ambiente. Revista Liberato 10:149-158.

RITZINGER, C.H.S.P. & FANCELLI, M. 2006. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. Revista Brasileira de Fruticultura 28:331-338.

ROCHA, L.R.; SOLL, C.B.; BOUGHTON, B.A.; SILVA, T.S.; OLDACH, K.; FIRMINO, A.A.P.; CALLAHAN, D.L.; SHEEDY, J.; SILVEIRA, E.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SILVA, L.P.; POLEZ, V.L.P.; PELEGRINI, P.B.; BACIC, A.; GROSSI DE SA, M.F. & ROESSNER, U. 2017. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. Biotechnology Research and Innovation 1: 87-100.

ROCHA, T.L.; MURAD, A.M.; EVARISTO, R.G. DE S.; ALMEIDA, W. DA S.; MAGALHÃES, J.C.C.; MATTAR, M.C.DA S. & GROSSI DE SÁ, M.F. 2006. Efeito nematicida de extratos aquosos de sementes de plantas sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. Comunicado técnico 144.

ROCHA, T.L.; POLEZ, V.L.P.; EVARISTO, R.G.S.; GROSSI DE SÁ, M.F.; DA SILVA, M.C.M.; SOUZA, D.S.L.; BACIC, A. & ROESSNER, U. 2013a. Relatório Descritivo de Patente de Invenção. Composição nematotóxica de efeito sinérgico Pedido Internacional: PCT Br 2013/00596.

ROCHA, T.L.; POLEZ, V.L.P.; EVARISTO, R.G.S.; GROSSI DE SÁ, M.F.; DA SILVA, M.C.M.; SOUZA, D.S.L.; BACIC, A. & ROESSNER, U. 2013b. Relatório Descritivo de Patente de Invenção. Uso de composição nematotóxica de efeito sinérgico. Pedido Internacional: PCT Br 2013/000598.

ROSENZWEIG, C. & LIVERMAN, D. 1992. Predicted effects of climate change on agriculture:

A comparison of temperate and tropical regions. Dalam Global Climate Change: Implications, Challenges, and Mitigation Measures. Dalam SK Majumdar (Ed.) The Pennsylvania Academy of Sciences. Pennsylvania. 342-61.

RYAN, M.G. 1990. Growth and maintenance respiration in stems of *Pinus contorta* and *Picea engelmannii*. Canadian Journal of Forest Research 20: 48-57.

SAHEBANI, N. & HADAVI, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology Biochemistry 40: 2016- 2020.

SALGADO, S.M.L. & CAMPOS, V.P. 2003. Extratos naturais na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro e de *Meloidogyne incognita* raça 3 em feijoeiro. Nematologia Brasileira 27: 41-48.

SANTOS, M.F.A. 2011. Diversidade de *Meloidogyne incognita* e espécies correlatas: como surgem abordagens biológicas, citológicas, morfológicas e moleculares. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. Plant Disease 64: 36-41.

SASSER J.N.; CARTER, C.C. & HARTMAN, K.M. 1984. Standardization of host suitability studies and reporting of resistance to root knot nematodes. A Cooperative Publication of the North Carolina State University. North Carolina, USA.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. A.; KLEIFELD, O. & SPIEGEL, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91:687-693.

SINGH, A. N & Dubey, V. K. 2011. Exploring applications of procerain B, a novel protease from *Calotropis procera*, and characterization by N-terminal sequencing as well as peptide mass fingerprinting. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164: 573-580.

SILVA, G.S. 1991. Identificação de espécies e raças de *Meloidogyne* associadas a hortaliças no estado do Maranhão. Nematologia Brasileira 15: 51-58.

SILVA, J.G.P. 2012. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. em diferentes fitofisionomias do Cerrado e hospedabilidade de plantas nativas a *Meloidogyne javanica*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasil.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S & KOBLITZ, M.G.B. 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Ciências Agrárias 31:669-682.

SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. & AGRA, M.F. 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). Química Nova 26: 517-522.

SILVA, T.M.S.; NASCIMENTO, R.J.; BATISTA, M.M.; AGRA, M.F. & CAMARA, C.A. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 35-38.

SILVA, T.M.; CAMARA, C.A.; FREIRE, K.R.L.; SILVA, T.C.; AGRA, M.F. & BHATTACHARYYA, J. 2008. Steroidal glycoalkaloids and molluscicidal activity of *Solanum asperum* Rich. fruits. *J. Braz. Chem. Soc.* 19:1048-1052.

SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G.S.; THODE, V.A.; DA SILVA, J.G. & MENTZ, L.A. 2008. A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 6:177-188.

SOARES, P.L.M. 2006. Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA.; GIACOMIN., L. & RODRIGUES, I.M.C. 2016. *Solanaceae*. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000225>. Consultado em 22/03/2019.

STIRLING, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects. CAB International. Wallingford.

SWAIN, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 479-501.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 1991. Ethylene and abscisic acid. *In: Plant Physiology*: Redwood City. Cummings. Washington. p.482-487.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia vegetal*. Artmed. Porto Alegre.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

TAKASUGI, M.; YACHIDA, Y.; ANETAI, M.; MASAMUNE, T. & KEGASAWA, K. 1975. Identification of asparagusic acid as a nematicide occurring naturally in the roots of asparagus. *Chemistry Letters* 4:43-44.

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*). Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Universidad del Estado de Carolina del Norte, USA.

THIES, C. 1997. *Die Krise des Individuums: ein Vergleich zwischen Adorno und Gehlen*. Hänsel-Hohenhausen.

THODEN, T.C.; BOPPRÉ, M. & HALLMANN, J. 2009. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science* 65: 823-830.

THOMPSON, H.W.; LASKY, L.C. & POLESKY, H.F. 1986. Evaluation of a volumetric

intravenous infusion pump for transfusion of blood components containing red cells. *Transfusion* 26:290-292.

TIHOHOD, D. 1993. *Nematologia Agrícola Aplicada*. Funep. Jaboticabal.

TRUDGILL, D.L. & BLOK, V.C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39:53-77.

VALADARES-INGLIS, M.C.; MARTINS, I.; SILVA, J.P. & MELLO, S.C.M. 2018. Seleção *in vitro* de linhagens de *Trichoderma* para controle da podridão-branca do alho e da cebola. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. EMBRAPA CENARGEN*. Brasília – DF.

VANHOLME, B.; DE MEUTTERN, J.; TYTGAT, T.; VAN MONTAGU, M.; COOMANS, A. & GHEYSEN, G. 2004. Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332:13-27.

VASANTHARAJ, D.B. 2008. Biotechnological approaches in IPM and their impact on environment. *Journal of Biopesticides* 1:1-5.

VEIGA, M. M. 2007. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Agricultura* 379:145-152.

VELASCO, L.O.M. & CAPANEMA, L.X.L. 2006. O setor de agroquímicos. *BNDS Setorial* 24:69-96.

WHITTAKER, R.H. & FENNY, P.P. 1971. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. *Science* 171:757-770.

WILCOX, G.J.; BARNES, A. & MONDANLOU, H. 1981. Does transfusion using a syringe infusion pump and small-gauge needle cause hemolysis? *Transfusion* 21:750-7.

WILLIAMSON, V. M & HUSSEY, R.S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 8:1735-1745.

WILLIAMSON, V.M. & KUMAR, A. 2006. Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22: 396-403.

WINK, M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 225-233.

WIRATNO, D.; TANIWIRYONOC, H.; VAN DER BERG, J A.G.; RIKSEND, I.M.C.M.; RIETJENS, S.R.; DJIWANTIA, J.E & KAMMENGAD, A. J. MURK. 2009. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, *The Open Natural Products Journal* 2009: 77-85.

WYLIE, T.; MARTIN, J.C.; DANTE, M.; MITREVA, M.D.; CLITTON, S.W.; CHINWALLA, A.; WATERSTON, R.H.; WILSON, R K & McCARTER, J.P. 2004. Nematode. net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes. *Nucleic Acids Research* 32: 423-

426.

ZHAO, N.; WANG, G.; NORRIS, A.; CHEN, X. & CHEN, F. 2013. Studying plant secondary metabolism in the age of genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 32: 369-382.