



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**EXTRATOS AQUOSOS RADICULARES DE PLANTAS DA FAMÍLIA
SOLANACEAE EXIBINDO ATIVIDADE NEMATOTÓXICA
NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

ADRIANA ANDRADE FERREIRA

BRASÍLIA-DF
2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**EXTRATOS AQUOSOS RADICULARES DE PLANTAS DA FAMÍLIA
SOLANACEAE EXIBINDO ATIVIDADE NEMATOTÓXICA NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

ADRIANA ANDRADE FERREIRA

BRASÍLIA-DF
2018

ADRIANA ANDRADE FERREIRA

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Cleber Furlanetto

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Adriana Andrade.

Extratos aquosos radiculares de plantas da família Solanaceae exibindo atividade nematotóxica no controle de *Meloidogyne incognita*./Adriana Andrade Ferreira.

Brasília, 2018.

Número de páginas p.134: il.

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

1. Fitopatologia – Nematologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Extratos aquosos radiculares de plantas da família Solanaceae exibindo atividade nematotóxica no controle de *Meloidogyne incognita*.

"Eu não sou forte. Forte é o Deus que habita em mim, Ele me faz forte e capaz de ir além, de lutar e vencer. O poder de Deus em minha vida me faz vencedora. Tudo posso naquele que me fortalece."

Bíblia Sagrada - adaptado

Dedico à minha família, aos meus colaboradores, aos meus amigos parceiros de trabalho e professores.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me concedido essa oportunidade, por toda a força que dele obtive para seguir em frente neste caminho e por todo o consolo que me concedeu no momento da perda de meu eterno e saudoso pai.

Aos meus familiares e irmãos pelo apoio e dedicação prestados a mim e a meu filho Samuel durante o curso. Ao meu pai ‘*in memoriam*’ pelo seu imenso carinho, apoio e por todas as vezes que vibrou comigo nos momentos felizes que pudemos compartilhar. Não foi fácil essa caminhada com a sua ausência nem as próximas serão, mas sei que de onde estás se pudesses me contemplar, contemplarias orgulhosamente e, acima de tudo, estarias imensamente orgulhoso, pois sempre desejou o melhor a mim e a Samuel. No entanto, esse orgulho ficará aos demais da nossa querida família Ferreira.

À minha mãe, pela compreensão nos dias de ausência, nos dias de lutas e em todos os momentos. Obrigada pelo apoio, pela moradia e pela força que tem passado a mim, principalmente, uma guerreira, minha rainha que tanto amo e admiro.

Meus mais sinceros agradecimentos ao pesquisador Thales Lima Rocha, meu pai na ciência, pelo apoio e confiança em meu potencial desde o início de minha jornada, por nunca ter desistido de ajudar uma de suas alunas, que estudou em uma faculdade particular, a ingressar em um dos programas conceituados na UnB, Programa de Pós Graduação em Fitopatologia. Sou imensamente grata à orientação prestada durante todo o tempo de execução de meu trabalho, a todas as vezes que vibramos juntos pelos resultados que obtivemos ao longo dessa caminhada, aos conselhos prestados e, principalmente, por ter a honra de ser a primeira aluna de mestrado a dar o pontapé na área da Nematologia na história do Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos - LPCB.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial aos laboratórios parceiros, Laboratório de Fitopatologia - Sueli Côrrea Marques de Mello e Irene Martins, o

meu muito obrigado pelo carinho, amizade, admiração, pelos equipamentos e reagentes cedidos, material biológico e ao apoio técnico prestado a mim durante execução do trabalho, sou muito grata a vocês pela parceria que formamos durante essa jornada.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT III), em especial ao pesquisador Jonny Everson Scherwinski Pereira, o meu muito obrigado pelo apoio prestado em toda a parte técnica necessária para a realização dos experimentos de fitotoxicidade.

Ao Laboratório de Genômica e Proteômica - pesquisadora Ângela Metha e alunas, por todo apoio prestado durante a execução do trabalho, pelos reagentes e equipamentos cedidos. Certamente, sem vocês não seria possível a conclusão dos trabalhos executados durante o curso.

À Embrapa Agroenergia, Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis, pesquisador responsável Clenison Martins, o meu muito obrigado pelos equipamentos e reagentes, ao apoio técnico e à confiança prestados a mim durante a execução do trabalho experimental na parte de fracionamento dos extratos nematotóxicos e identificação de compostos.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa, pesquisador Carlos Bloch e a toda sua equipe, em especial a Beatriz Blenda P. de Souza, o meu muito obrigado pelo apoio prestado em toda a parte técnica correlacionada à purificação dos extratos por cromatografia via HPLC assim como pela disponibilidade dos reagentes e demais equipamentos necessários à execução das atividades. Agradeço ainda pela confiança e, acima de tudo, pela amizade que construímos.

À Embrapa Cerrados - Laboratório de Microbiologia de Solos e Micorriza, em especial ao pesquisador Fabio Bueno dos Reis Júnior, que forneceu a estrutura, os materiais e equipamentos necessários em prol do desenvolvimento das atividades relacionadas aos bioensaios de especificidade utilizando organismo não alvo, bactérias fixadoras de nitrogênio.

Aos amigos de trabalho - José Gilson de Souza e Sr. Oretes, pelo carinho, amizade e apoio em toda a parte técnica necessária à realização dos experimentos em laboratório e em casa de vegetação, bem como aos conselhos prestados durante as horas difíceis encontradas no decorrer do trabalho.

À Juliana Cristina Gomes pelo apoio, carinho, confiança, amizade e pelos conselhos prestados e a todas as ajudas oferecidas na parte de purificação e identificação das classes químicas das distintas amostras. Muito obrigado pela dedicação prestada a mim, sem você não seria possível realizar parte de meu trabalho e a conclusão do mesmo.

Aos demais funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Cerrados pela amizade e colaboração.

Aos funcionários e colegas da UnB, pela amizade, confiança e colaboração em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Cleber Furlanetto, pela tranquilidade, confiança e ensinamentos.

Aos professores Juvenil Enrique Cares, Adalberto Café, Marisa Ferreira, Helson Vale, Luiz Blum, Rita Pereira, Danilo Pinho, Sueli Mello, Renato Resende, Alice Nagata, por todos os ensinamentos prestados, confiança, admiração e pela rica oportunidade em poder fazer parte dessa equipe maravilhosa e por terem me dado a honra de ingressar no Programa de Pós-Graduação.

Aos meus colegas de curso de pós-graduação, em especial Paula Darliny S. Ferreira, por sua ajuda, apoio nos momentos de alegria e de perdas, ao carinho, à admiração, às longas noites de estudos e à verdadeira amizade que construímos durante essa trajetória.

Ao Pimentel Rodrigues por todas as ajudas experimentais concernentes aos experimentos realizados em casa de vegetação, ao apoio técnico prestado em todas as execuções das leituras nematológicas, bem como apoio para execução dos resultados obtidos, sua presença foi

imprescindível para a conclusão desta etapa neste trabalho, sem ela não seria possível sua conclusão. Obrigado pela admiração e a todos os conhecimentos que pude adquirir com seus ensinamentos.

Em especial ao Professor Juvenil E. Cares, por todo o apoio prestado e carinho externado a mim e ao meu trabalho, pelas ajudas, pelos conselhos e pela dedicação para comigo. Palavras não descreveriam o que sinto e a gratidão que tenho por sua pessoa, um exemplo de professor, exemplo de pessoa, de humildade, exemplo de profissional, hoje se cheguei onde cheguei e tanto aprendi, em grande parte foi graças a ti.

Aos professores que irão compor a banca examinadora, muito obrigado, em especial, Jansen Santos, pela disposição, carinho e confiança.

À colaboração da querida Prof^a. Gaziella Joanitii na execução de parte do meu trabalho e a Alicia Ombredane pelo apoio prestado durante o curso e pela colaboração. O meu muito obrigado a vocês por fazerem parte desse trabalho que foi tão precioso.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado possibilitando que eu pudesse me dedicar exclusivamente à execução da minha dissertação de mestrado.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor **Cleber Furlanetto, Ph.D.**, com apoio da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Agroenergia, Embrapa Cerrados e apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

**Extratos aquosos radiculares de plantas da família Solanaceae exibindo atividade
nematotóxica no controle de
Meloidogyne incognita.**

ADRIANA ANDRADE FERREIRA

Dissertação aprovada em 07/12/2018 por:

Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos

Examinador

Prof^a. Pérola de Oliveira Magalhães

Examinador (Externo)

Prof^o. Juvenil Enrique Cares

Suplente

Prof. Cleber Furlanetto

Orientador (Presidente)

BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL

2018

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	x
RESUMO GERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Nematoides	5
2.2. <i>Meloidogyne incognita</i>	6
2.3. Ciclo de vida.....	6
2.4. Métodos de controle	8
2.5. Agrotóxicos	15
2.6. Extratos vegetais.....	19
2.7. Metabolismo vegetal.....	20
2.8. Classe de compostos vegetais.....	21
2.8.1. Terpenos.....	21
2.8.2. Compostos fenólicos.....	22
2.8.3. Alcaloides	23
2.9. Substâncias vegetais bioativas.....	25
2.10. Família Solanaceae	30
2.11 . Potencial biológico de plantas da família Solanaceae	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Multiplicação de <i>Meloidogyne incognita</i> em plantas de tabaco.....	36
3.2. Extração de ovos e obtenção de J ₂ de <i>M. incognita</i> a partir de raízes de tabaco.....	36
3.3. Obtenção e manutenção de solanáceas silvestres em casa de vegetação	37

3.4. Obtenção dos extratos crus aquosos (ECAs) das raízes de solanáceas	38
3.5. Determinação da atividade nematotóxica dos ECAS utilizando juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	39
3.6. Certificação da ação nematicida dos ECAs - Ensaio de recuperação.....	40
3.7. Avaliação da termoestabilidade dos ECAs.....	40
3.8. Avaliação da atividade dos ECAs sobre a eclosão de juvenis de <i>M. incognita</i>	42
3.9. Avaliação de curva de concentração e dose letal média (DL ₅₀).....	42
3.10. Fracionamento e pré-concentração dos extratos aquosos em fase sólida (SPE-C18) .	43
3.11. Avaliação da ação nematotóxica dos eluatos após extração em fase sólida (SPE-C18) sobre J ₂ de <i>M. incognita</i>	44
3.12. Purificação por Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-HPLC) do eluato nematotóxico da espécie 5	45
3.13. Validação da infectividade dos juvenis de <i>M. incognita</i> em mudas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthii após 48 horas de exposição aos ECAs das espécies 4 e 5.....	46
3.13.1. Determinação do fator de reprodução, número de galhas e massa de ovos.....	47
3.14. Avaliação de fitotoxicidade em semente de soja.....	48
3.15. Avaliação de toxicidade sobre hemácias	49
3.16. Avaliação de toxicidade sobre fibroblastos	50
3.17. Bioensaio de especificidade utilizando organismos não-alvo	52
3.17.1. Bioensaio utilizando bactérias	53
3.17.2. Bioensaio utilizando fungos filamentosos	54
3.17.3. Bioensaio utilizando levedura.....	56
3.18. Identificação da fração majoritária via LC-MS/UPLC-PDA (ECA espécie 1).....	57
3.19. Determinação da atividade nematotóxica <i>in vitro</i> da fração cromatográfica identificada e de composto adquirido da SIGMA	57
3.20. Liofilização dos ECAs, eluatos e frações cromatográficas	58
4. RESULTADOS	58

4.1. Avaliação por bioensaio <i>in vitro</i> dos ECAs oriundos de raízes de plantas da família Solanaceae sobre J ₂ de <i>M. incognita</i>	58
4.2. Avaliação da termoestabilidade dos ECAs.....	60
4.3. Ação dos ECAs sobre a eclosão de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i>	62
4.4. Avaliação curva de concentração e DL ₅₀	64
4.5. Ação dos eluatos fracionados por SPE-C18 dos ECAs das espécies 1, 4, e 5 sobre J ₂ <i>M. incognita</i>	67
4.6. Purificação do eluato mais efetivo da espécie 5 via HPLC	69
4.7. Ação nematotóxica do eluato nematicida da espécie 5 via HPLC	70
4.8. Avaliação em casa de vegetação dos juvenis de segundo estágio (J ₂) após exposição de 48 horas aos ECAs das espécies 4 e 5 em diferentes concentrações	72
4.9. Avaliação da fitotoxicidade sobre a germinação de sementes de soja (<i>Glycine max</i>) ..	76
4.10. Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias	78
4.11. Avaliação de citotoxicidade sobre fibroblastos (NIH3T3).....	79
4.12. Avaliação da especificidade sobre organismos não alvo.....	81
4.12.1. Bactérias benéficas presentes na rizosfera.....	81
4.12.2. Fungos benéficos - <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>T. harzianum</i>	82
4.12.3. Levedura benéfica - <i>Candida maltosa</i> CA 49.....	87
4.13. Purificação do extrato cru aquoso da espécie 1 via UPLC-PDA	88
4.14. Bioensaio <i>in vitro</i> da fração cromatográfica identificada (Escopoletina)	89
5. DISCUSSÃO.....	91
6. CONCLUSÕES.....	102
6. PERSPECTIVAS	104
LITERATURA CITADA.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias da dose letal média (DL_{50}) capaz de matar 50% dos juvenis de <i>M. incognita</i> dos ECAs das espécies 01, 04 e 05.	67
Tabela 2. Médias de comprimento de haste (Comp. Haste), Número de Massas de Ovos (NMO), Número de Galhas (NG), Fator de Reprodução (FR) e Número de Ovos e/ou Juvenis de segundo estágio (J_2) por grama de raiz (NOJ_2/GR), obtidas em tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthii) para a espécie <i>Meloidogyne incognita</i> após 30 dias da aplicação dos tratamentos.	75
Tabela 3. Avaliação de fitotoxicidade das variáveis das plântulas de soja submetidas a 1 mg dos ECAS das espécies 1, 4 e 5 em meio MS 12 dias após a semeadura.	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Raízes das cinco espécies de solanáceas selvagens utilizadas para a obtenção dos ECAs. (A) espécie 1; (B) espécie 2; (C) espécie 3; (D) espécie 4; (E) espécie 5 (Fotos: Adriana A. Ferreira). 38
- Figura 2.** Procedimento de maceração de raízes em cadinho, após o resfriamento em nitrogênio líquido para a obtenção dos ECAs (Foto: Adriana A. Ferreira). 39
- Figura 3.** Bioensaio *in vitro* de viabilidade para selecionar o(s) extrato(s) cru(s) aquosos(s) de raiz de cinco espécies de plantas da família Solanaceae mais efetivo(s) sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. Controle positivo etanol 70%, controle negativo, dH₂O. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos tratamentos das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 quando comparados com o controle negativo dH₂O. Barras com “****” não difere entre si, com: $p < 0,0001$ 59
- Figura 4.** Ensaio de recuperação dos juvenis de *Meloidogyne incognita* demonstrando o efeito nematocida dos ECAs extraído de raízes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae. Controle positivo etanol 70% e controle negativo, dH₂O. Barras com letras iguais não diferiram entre si pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH₂O: Barras contendo letras iguais não diferem entre si, com: $p < 0,0001$ 60
- Figura 5.** Bioensaio de termoestabilidade (50 °C) *in vitro* dos ECAs de raízes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae, 1mg/ml⁻¹. Controle negativo e positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH₂O, barras com “****” não diferem entre si, com: $p < 0,0001$ 61
- Figura 6.** Ensaio de recuperação demonstrando o efeito nematotóxico dos ECAs submetidos à 50 °C após 24 horas em água. Controle negativo: água destilada, controle positivo: etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos tratamentos das espécies 1, 2, 4 e 5 quando comparados com o controle negativo dH₂O. Barras com “****” não diferem entre si com: $p < 0,0001$ 62
- Figura 7.** Bioensaio *in vitro* utilizando 100 ovos de *Meloidogyne incognita* submetidos a concentração de (3mg. ml⁻¹) dos ECAs de raízes de solanáceas das espécies: 1, 4 e 5. Controle negativo H₂O e a suspensão de ovos, controle positivo NaOCl 0,06% de cloro ativo. Teste ANOVA Two-way com pos teste Tukey. “a”, “b” e “c”: diferentes entre si com $p < 0,05$ 63

Figura 8. Linha (1): ovos viáveis de <i>Meloidogyne incognita</i> em várias fases do desenvolvimento embrionário, linha (2): ovos inviáveis de <i>M. incognita</i> em distintas fases do desenvolvimento embrionário idênticos aos ovos da linha (1). Linha (2), ovos apresentando rompimento de membrana linha (2A) e presença de vacúolos (2B, 2C, 2D) após 15 dias de exposição aos ECAs das espécies 1, 4 e 5 em uma concentração de 3mg.ml ⁻¹ (Fotos: Adriana A. Ferreira).....	64
Figura 9. Bioensaio <i>in vitro</i> -curva de concentrações (µg.ml ⁻¹) do(s) extrato(s) cru(s) aquosos(s) de raízes das espécies 1, 4 e 5 de plantas da família Solanaceae sobre juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> após 48 horas de exposição para avaliar a concentração mínima de atividade dos ECAs sobre os juvenis. Controle negativo e positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH ₂ O. Barras com “****” não difere entre si, com: p<0,0001.....	65
Figura 10. Ensaio de recuperação curva de concentração. Juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> , após 24 horas em água, certificando a correlação entre a concentração e o tipo de atividade nematotóxica para cada ECA de raiz de plantas da família Solanaceae. Controle positivo etanol 70% e controle negativo: dH ₂ O. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH ₂ O. Barras com “****” não difere entre si, com: p<0,0001; barra com “***” difere dos demais tratamentos, com: p<0,01.....	66
Figura 11. Bioensaio de avaliação <i>in vitro</i> dos eluatos obtidos via cromatografia sólida, SPE-C18 sobre J ₂ de <i>M. incognita</i> . Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo e positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos grupos de cada eluato quando comparado com controle negativo dH ₂ O e com eles mesmos. Barras com “****” não difere entre si, com: p<0,0001.....	68
Figura 12. Ensaio de recuperação <i>in vitro</i> demonstrando o tipo de atividade nematicida e/ou nematostática dos eluatos das espécies 1, 4 e 5 sobre J ₂ de <i>M. incognita</i> , após 24 horas de exposição em água. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos grupos quando comparados com controle negativo dH ₂ O. Barras contendo as mesmas quantidades de “*” não diferem entre si, com: ****: p<0,0001; ***:p<0,001 e *:p<0,05.....	69
Figura 13. Cromatograma do 1º Eluato da espécie 5 representando os 7 grupos.	70
Figura 14. Bioensaio <i>in vitro</i> utilizando os grupos 1, 2 e 3 contidos no eluato 1 do ECA de raiz de planta da espécie 5 sobre juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> . Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo e controle positivo água e etanol 70%.	

Teste ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado os grupos “a” e “b” com controle negativo H ₂ O: Barras contendo letra iguais não difere entre si, com: p<0,0001.....	71
Figura 15. Ensaio <i>in vitro</i> de recuperação demonstrando atividade nematicida nematostática dos grupos 1, 2 e 3 sobre J ₂ de <i>M. incognita</i> , após 24 horas de exposição em água. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com o controle negativo.****: p<0,0001.....	72
Figura 16. Plantas de tabaco do grupo de tratamento da testemunha água: (A) tabaco apresentando início de floração; (B) raízes de tabaco assintomáticas (Fotos: Adriana A. Ferreira).....	73
Figura 17. Sintomas e sinais resultantes da interação nematoide-raiz de tabaco. Em (A) fêmeas sedentárias de <i>Meloidogyne incognita</i> com corpo dentro da raiz, em (B) massa de ovos depositadas externamente a raiz de tabaco por fêmeas de <i>M. incognita</i> , em (C) fêmea de <i>M. incognita</i> com parte do corpo fora em raiz de tabaco, em (D) sintomas de galhas radiculares em raiz de tabaco provocado por fêmeas de <i>M. incognita</i> (Fotos: Adriana A. Ferreira).....	74
Figura 18. Plântulas de soja germinadas de sementes (A) 12 dias após a semeadura em meio MS, em (B) as mesmas plântulas destacando o comprimento das raízes bem como o crescimento da haste (Fotos: Adriana Andrade Ferreira).....	77
Figura 19. Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> utilizando ECAs das cinco espécies de solanáceas sobre hemácias suínas (500 µg/300 µl). Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle positivo dH ₂ O. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. One-way ANOVA. Diferença significativa quando comparado os tratamentos das espécies 2, 3, 4, e 5 com controle H ₂ O. Espécie 1 não houve diferença significativa quando comparado com o controle H ₂ O. Barra contendo “****” não difere entre si, com: p<0,0001.....	78
Figura 20. Citotoxicidade das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 em fibroblastos (NIH3T3) isolados de mamífero após 24 horas de exposição nas concentrações de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 µg/ml. Diferença significativa quando comparados os grupos “a”, “b”, “c”, “d” e “e” entre si pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste Tukey p<0,05.	80
Figura 21. Citotoxicidade das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 em fibroblastos (NIH3T3) isolados de mamífero após 48 horas de exposição nas concentrações de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 µg/ml. Diferença significativa quando comparados os grupos ‘a’, ‘b’ e ‘c’ entre si pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste Tukey, com: p<0,05. Barras contendo letras iguais não diferem entre si, com: p<0,0001.....	80

Figura 22. Bioensaio <i>in vitro</i> usando ECAs de raízes das cinco espécies de plantas da família Solanaceae sobre a bactéria <i>Azospirillum brasiliense</i> (AbV6), multiplicada sobre meio DYGS, onde os números representados nos discos de papel correspondem aos ECAs das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente (Fotos: Adriana A. Ferreira).	81
Figura 23. Bioensaio <i>in vitro</i> usando ECAs das cinco espécies de plantas da família Solanaceae sobre o crescimento de <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (SEMIA 5080), crescidos sobre o meio YMA, onde os números representados nos discos de papel 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem aos ECAs de raízes das espécies 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Fotos: Adriana A. Ferreira).	82
Figura 24. Crescimento micelial de <i>Trichoderma asperellum</i> em meio Batata dextrose ágar com 15 mg de um dos cinco ECAs de raízes de plantas da família Solanaceae: (A) controle negativo; (B) ECA espécie 1; (C) ECA espécie 2; (D) ECA espécie 3; (E): ECA espécie 4; (F): ECA espécie 5 (Fotos: Adriana A. Ferreira).	83
Figura 25. Crescimento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> em meio Batata dextrose ágar com 15 mg de um dos cinco ECAs de raízes de plantas da família Solanaceae: (A) controle negativo; (B) ECA espécie 1; (C) ECA espécie 2; (D) ECA espécie 3; (E): ECA espécie 4; (F): ECA espécie 5 (Fotos: Adriana A. Ferreira).	84
Figura 26. Mensuração da inibição do crescimento micelial de <i>T. harzianum</i> e <i>T. asperellum</i> durante três dias de crescimento sobre meio batata dextrose ágar acrescido de 15 mg do ECA espécie 1. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle *****: $p < 0,0001$ e ***: $p < 0,001$	85
Figura 27. Germinação dos conídios e o desenvolvimento de micélio de <i>Trichoderma asperellum</i> do controle negativo em (A) indicados nas setas, e em (B) germinação dos conídios e o desenvolvimento de micélio após tratamento com 15 mg do ECA da espécie 1, indicados nas setas após 16 horas de crescimento. Escala das fotos: 5 μ m (Fotos: Adriana A. Ferreira).	86
Figura 28. Germinação dos conídios de <i>Trichoderma harzianum</i> do controle negativo indicados nas setas em (A) e em (B) germinação dos conídios e o desenvolvimento de tubos germinativos maiores, indicados nas setas, após tratamento com 15 mg do ECA da espécie 1, após 16 horas de crescimento sobre lâmina. Escala das fotos: 5 μ m (Fotos: Adriana A. Ferreira).	87
Figura 29. Bioensaio <i>in vitro</i> usando os ECAs das cinco espécies de plantas da família Solanaceae sobre o crescimento de <i>Candida maltosa</i> CA 49. Os números (1, 2, 3, 4 e 5)	

representados nos discos de papel correspondem aos extratos usados dos ECAs das respectivas espécies (Fotos: Adriana A. Ferreira).....	87
Figura 30. Espectro do extrato cru aquoso de raiz da espécie 1, onde o maior pico representa uma cumarina. A análise foi realizada utilizando UPLC/PDA coluna: Acquity UPLC® HSS T3 C18 1,8 µm 2,1x150 mm; Temperatura da coluna: 40°C; Fase móvel - solvente A: H ₂ O Milli-Q/TFA 0,1%; solvente B: Acetonitrila/TFA 0,1%.	88
Figura 31. Espectro UV referente ao pico cromatográfico indicado na seta preta (Figura 30) com tempo de retenção em 22 minutos, indicando a presença de escopoletina (Bhatt <i>et al</i> , 2011).....	89
Figura 32. Bioensaio <i>in vitro</i> utilizando composto identificado via UPLC/PDA e o composto adquirido da SIGMA com concentração de (50µg.500µL ⁻¹) sobre J ₂ de <i>M. incognita</i> , onde permaneceram por 48 horas em exposição. Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo e positivo água destilada e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com o controle negativo****: p<0,0001.....	90

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

MS- Murashige & Skoog (meio de cultura)	LC-MS- Cromatografia Líquida acoplada Espectômetro de Massas
BDA- batata dextrose ágar (meio de cultura)	RP-HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
YMA- Yeast Mannitol Agar (meio de cultura)	SPE- Cromatografia Extração em Fase Sólida
DYGS- Dextrose Yeast Glucose Sucrose (meio de cultura)	TFA- ácido trifluoacético
YPD- Yeast extract Peptone Dextrose (meio de cultura)	UV- ultravioleta
nm- nanômetro	MF- matéria fresca
mm- milímetro	MS- matéria seca
cm- centímetro	MCA- medida colo ápice
cm²- centímetro quadrado	EUA- Estados Unidos da América
cm³- centímetro cúbico	Conab- Companhia Nacional de Abastecimento
mg- miligrama	FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
µl- microlitro	EPA- Agência de Proteção Ambiental
µg- micrograma	MMA- Ministério do Meio Ambiente
g- grama	MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ml⁻¹- por mililitro	OMC- Organização Mundial da Saúde
ml- mililitro	NCCLS- Comitê Nacional para Laboratório de Análises Clínicas
(v/v)- volume por volume	J₁, J₂, J₃, J₄- estádios dos juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> , juvenil de primeiro, segundo, terceiro e quarto estágio, respectivamente.
β- beta	NMO- número de massa de ovos
%- porcentagem	NG- número de galhas
°C- graus Celsius	NOJ₂/Gr- numero de ovos e J2 por grama de raiz
C- Carbono	
min.- minuto	
pH- potencial hidrogeniônico	
dH₂O- água destilada	
H₂O- água	
EtOH- álcool etílico	
HPLC- High Performance Liquid	

FR- fator de reprodução
ECA- Extrato Cru Aquoso
NaOCL- hipoclorito de sódio
M.C.A- medida do colo ao ápice
p.f- peso fresco
p.s- peso seco
rpm- rotação por minuto
h- horas
NaCL- cloreto do sódio
AU- absorvância
kDa- kilodalton
CO₂- gás carbônico
O₂- oxigênio
n°- número
MTT- [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo]
DMSO- dimetilsulfóxido
ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunológico com enzima conjugada)
NAD⁺- nicotinamida adenina dinucleotídeo

RESUMO GERAL

FERREIRA, Adriana Andrade. Extratos aquosos radiculares de plantas da família Solanaceae exibindo atividade nematotóxica no controle de *Meloidogyne incognita*. 2018. Número de páginas (134). Mestrado em Fitopatologia - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A produtividade das culturas brasileiras é fortemente afetada pelo parasitismo de nematoides, os quais comprometem a produção de alimentos e acarretam perdas econômicas relevantes à balança comercial brasileira. Neste contexto, os nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp., estão entre os principais patógenos causadores de danos às culturas no Brasil e no mundo. A utilização indiscriminada de nematicidas sintéticos para o controle desse nematoide pode causar efeitos indesejáveis à saúde humana, animal, ao meio ambiente. No Brasil, plantas da família Solanaceae estão presentes em todos os biomas, sendo fonte de metabólitos secundários de diversas classes químicas, os quais são utilizados para diferentes finalidades. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi obter, por meio de maceração, extratos crus aquosos (ECAs) e frações oriundas de raízes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae e testar os seus efeitos na mortalidade e inibição da eclosão de juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*. Adicionalmente foi avaliado também a estabilidade térmica, citotoxicidade, fitotoxicidade e especificidade sobre organismos não alvo comumente encontrados na rizosfera de plantas cultivadas. Dentre os ECAs das espécies de plantas avaliadas, o ECA da espécie 5 foi o mais efetivo para todas as variáveis analisadas, tendo apresentado 99% de mortalidade de J₂, inibição de 99% da taxa de eclosão de juvenis e DL₅₀ de 336 µg/ml⁻¹. Além disso, o ECA da espécie 5 apresentou estabilidade térmica, após exposição a 50 °C durante 24 horas e ausência de efeito citotóxico sobre a germinação de sementes de soja e de toxicidade sobre hemácias suínas. Ainda foi observada ausência de atividade sobre organismos não alvo, como fungos, levedura e bactérias fixadoras de nitrogênio. O fracionamento do ECA da espécie 5 por cromatografia sólida (SPE-C18)

separou 4 eluatos sendo o eluato 1 e 2 os mais efetivos com 96% e 80% dos J₂ mortos, após 48 horas de exposição. A purificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) do eluato 1 da referida espécie, utilizando coluna semi-preparativa C-18 gerou 56 frações, as quais foram reunidas em 7 grupos sendo o grupo 3 o mais ativo exibindo ação nematostática acima de 98%. Análise por LC-MS-MS do grupo 3 indicou a presença de cumarinas. Em relação aos bioensaios em casa de vegetação utilizando J₂ previamente tratados por 48 horas com diferentes concentrações dos ECAs das espécies 4 e 5 foi observado que o ECA da espécie 5 foi o mais efetivo reduzindo significativamente o número de massa de ovos e de galhas radiculares. Os dados gerados neste trabalho evidenciam a potencialidade nematicida do ECA de raízes da espécie 5 pertencente a família Solanaceae e coloca em perspectiva a possibilidade de controle simultâneo de J₂ eclodidos e na eclosão e ovos de *M. incognita*, um dos mais problemáticos fitoparasitas da agricultura brasileira.

Palavras-chave: Controle, Metabólitos secundários, Nematicidas naturais, Nematoides das galhas

Orientador - Cleber Furlanetto - Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Adriana Andrade. Aqueous extracts of plants of the Solanaceae family exhibiting nematotoxic activity on the control of *Meloidogyne incognita*. 2018. Page numbers 134. Master in Plant Pathology - Universidade de Brasília. Brasília. DF. Brazil.

The productivity of Brazilian crops is strongly affected by nematode parasitism, which compromises food production and entails economic losses relevant to the Brazilian trade balance. In this context, the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., are among the main pathogens that cause damage to crops in Brazil and worldwide. The indiscriminate use of synthetic nematicides for the control of this nematode may cause undesirable effects on human and animal health, on the environment. In Brazil, plants of the family Solanaceae are present in all biomes, being source of secondary metabolites of several chemical classes, which can be used for different purposes. In this context, the objective of this work was to obtain aqueous crude extracts (ACE) and fractions from roots of five species of plants belonging to Solanaceae family and to test their effects on mortality and inhibition of hatching of second stage juveniles (J₂) of *M. incognita*. In addition, thermal stability, cytotoxicity, phytotoxicity and specificity were also evaluated on non-target organisms commonly found in the rhizosphere of cultivated plants. Among the ACEs of the plants species evaluated, the ACE of species 5 was the most effective for all the analyzed variables, presenting 99% J₂ mortality, 95% inhibition of juvenile hatching rate and DL₅₀ of 336 µg/ml⁻¹. In addition, the ACE of the species 5 presented thermal stability, after exposure to 50 °C during 24 hours and absence of phytotoxic effect on the germination of soybean seeds and of cytotoxicity on pig red blood cells and mammalian fibroblasts. The absence of activity on non-target organisms such as fungi, yeast and nitrogen-fixing bacteria was also observed. Fractionation of the ACE of species 5 by solid chromatography (SPE-C18) separated 4 eluates with eluate 1 being the most effective with 95% of J₂ dead after 48 hours exposure. Purification of eluate 1 by high

performance liquid chromatography (HPLC) using a C-18 semi-preparative column generated 56 fractions, which were pooled into 7 groups being the group 3 the most active exhibiting nematostatic action above 98%. LC-MS-MS analysis of group 3 indicated the presence of coumarins. In the greenhouse bioassays using J₂ previously treated for 48 hours with different concentrations of ACEs from species 4 and 5, it was observed that the ACE of the species 5 was the most effective reducing significantly the number of eggs mass and root galls. The data generated in this work show the nematicidal potential of the ECA of roots from species 5 belonging to the family Solanaceae and puts in perspective the possibility of simultaneous control of J₂ hatchlings and eggs of *M. incognita*, one of the most problematic phytoparasites of Brazilian agriculture.

Keywords: Control, Metabolites secondary, Natural nematicides, Root-knot nematodes

Adivisor – Prof^o. Cleber Furlanetto - Universidade de Brasília.

1. INTRODUÇÃO

Em associação com a crescente produção agrícola, estão os vastos desafios enfrentados a cada safra. Entre eles, destacam-se as pragas e patógenos que afetam a produtividade causando danos desde a semeadura até a chegada do produto ao consumidor. Estima-se que o prejuízo na agricultura, em razão do ataque desses organismos, alcance o valor de 310 bilhões de dólares americanos anuais (FAO, 2017).

Em decorrência disso, observa-se a cada ano um aumento acentuado dos gastos econômicos com produtos químicos sintéticos, como pesticidas empregados pelos agricultores (Conab, 2017a).

Entre os diversos patógenos que afetam severamente a produção agrícola, pode-se citar os nematoides causadores das galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göldi, 1892 com destaque para a espécie *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. Este fitoparasita apresenta ampla distribuição geográfica, vasta gama de plantas hospedeiras, incluindo várias espécies cultivadas, causa perdas econômicas consideráveis e pode ser disseminado por meio de tratos culturais, água das chuvas e de irrigação, animais e material propagativo contaminado (Wiratno, 2009).

O ciclo de vida desse organismo é relativamente curto, em média 28 dias em temperaturas ambientais variando de 28 a 30 °C, sendo a forma infectante os juvenis de segundo estágio (J₂). Os juvenis, ao penetrarem na parte apical das raízes, com a ação de enzimas expressas por eles, migram ao longo do córtex e estabelecem o sítio de alimentação no cilindro vascular. Ao estabelecer o sítio de alimentação, esses juvenis excretam enzimas necessárias para o estabelecimento das células gigantes e permanecem nesse local até a fase adulta. Como resposta à infecção do nematoide, as plantas produzem sintomas conhecidos

como galhas, o que define o nematoide como nematoide das galhas radiculares (Wiratno, 2009; Perry & Moens, 2011; Escobar *et al.*, 2015).

As estratégias utilizadas para o controle deste fitoparasita consistem na rotação de culturas, no uso de variedades resistentes, no manejo integrado de pragas/patógenos, no uso do controle biológico, e na aplicação de nematicidas sintéticos (Lordello, 1984; Chitwood, 2002; Lopes *et al.*, 2011; Escobar *et al.*, 2015; Gowen, 2017; FAO, 2017). Contudo, a estratégia de controle mais utilizada está centrada no uso maciço de nematicidas sintéticos que resultam no comprometimento da saúde humana, animal e severos danos ao meio ambiente (Abad *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2011; Escobar *et al.*, 2015; FAO, 2017; Gowen, 2017;).

Nos últimos anos, mudanças significativas ocorreram na lista de agrotóxicos legalmente comercializados na União Europeia (Diretiva 91/414/CEE) e cerca de 704 substâncias ativas foram banidas do mercado (Karabelas *et al.*, 2009). Adicionalmente, a EPA (Environmental Protection Agency) nos EUA também decidiu aumentar o controle sobre o registro de agrotóxicos e o nível de tolerância que seja seguro para saúde humana e o ambiente (EPA, 2013). Ainda em 2009, a União Europeia definiu novas regras visando reduzir os riscos e impactos do uso de agrotóxicos (Diretiva 2009/128/CE) (EC, 2013). Desse modo, a restrição ao uso de químicos sintéticos em culturas agrícolas é uma realidade mundial (Ntalli & Cabon, 2012).

Ao longo dos últimos 20 anos, um grande número de espécies de plantas têm sido descritas como detentoras de grande variedade de extratos, frações e compostos com ações fungicidas, bactericidas, insecticidas e nematotóxicas (Oliveira *et al.*, 2009; Cantrell *et al.*, 2012; Abdel-Rahman *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Caboni *et al.*, 2014; Seiber *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2017; Tiku, 2018).

Nesse contexto, a família Solanaceae A. L. Jussieu é considerada uma das maiores famílias entre as plantas angiospermas e está globalmente distribuída. A América do Sul

constitui um dos principais centros de diversidade e endemismo desta família botânica que é representada por aproximadamente 3000 espécies distribuídas em 106 gêneros. No Brasil, cerca de 350 espécies já foram identificadas, muitas delas endêmicas (Corrêa, 2015; Pereira, 2016).

Dentre os gêneros da família Solanaceae, o gênero *Solanum* L. é o maior e mais complexo. Diversas espécies de plantas desta família apresentam compostos com potencial biotecnológico, como os alcaloides (hioscina, nicotina, saponina), glicosídeos, glicocalcoides, diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides (Silva *et al.*, 2003; Corrêa, 2015; Pereira, 2016).

Datura stramonium L. e *D. metel* L., também são exemplos de espécies de solanáceas utilizadas no controle de fitonematoídeos de diferentes gêneros de fitonematoídeos. Compostos dos mais variados já foram isolados de extratos foliares de diversas espécies de plantas pertencentes ao gênero *Datura*, como a atropina, escopolamina, hioscina, saponina (Parakuash & Rao, 1948).

Tagetes spp., é um exemplo também de uma espécie de solanácea relatada como sendo uma das primeiras plantas que foram usadas na redução de nematoídeos do solo. Substâncias isoladas de raízes de *Tagetes patula* L. e *T. erecta* L. como terthienyl e derivados de bithienyl reduzem população de *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (Singh & Prasad, 2014). Diversos compostos já foram isolados de extratos foliares de diversas espécies de plantas pertencentes a esse gênero, como a atropina, escopolamina, hioscina, saponina (Parakuash & Rao, 1948).

Considerando a grande diversidade de plantas presentes na flora brasileira e sabendo-se que as espécies da família Solanaceae produzem uma variedade de metabólitos secundários de diferentes classes químicas, com variadas atividades biológicas, é de grande importância que estudos mais detalhados e avançados com extratos, frações e compostos sejam realizados para contribuir com o conhecimento de novas opções de controle de fitopatógenos, em especial no

controle de nematoides fitoparasitas para uso em conjunto com as opções já existentes (Eich, 2008; Corrêa, 2015; Pereira, 2016).

Diante desse cenário, existe constante demanda pela busca de substâncias bioativas inovadoras de origem natural que possuam ampla diversidade estrutural e biológica, visando a obtenção de novos produtos nematotóxicos (Clardy, 2004 ; Lopes *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017). Wiratno (2009), Rocha e colaboradores (2017) estudaram diversos extratos obtidos a partir de diferentes partes de plantas, como folha, flor, fruto, semente, raiz e caule, identificando efeito nematotóxico efetivo sobre *M. incognita*. Abdel-Rahman, (2013), menciona que efeitos sobre essa espécie de nematoide normalmente está relacionada à presença de compostos bioativos, tais como: ácidos orgânicos, alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides, aminoácidos, glicosídeos entre outros.

Considerando o potencial nematotóxico presente em plantas da família Solanaceae, a prospecção de extratos, frações e respectivos compostos com toxicidade seletiva a nematoides, figuram como ferramenta biotecnológica promissora no controle desse fitopatógeno como alternativa aos métodos de controle utilizados atualmente, sobre maneira a *M. incognita* (Hawkes, 1999; Stehmann, 2015; Rocha *et al.*, 20017).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi obter e selecionar, entre extratos crus aquosos (ECAs) oriundos de raízes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae, os mais efetivos, com ação nematotóxica sobre J₂ e inibição da eclosão de juvenis de *M. incognita*, bem como caracterizá-los quanto à termoestabilidade, citotoxicidade, fitotoxicidade e ação sobre organismos não alvo, além de fracioná-los, purificar suas frações e identificá-las por técnicas cromatográficas e de espectrometria de massa. Os ECAs das espécies 1, 4 e 5 foram selecionados para as etapas posteriores de cromatografia sólida e posteriores investigações químicas devido aos resultados obtidos ao longo do estudo e a disponibilidade/quantidade de material biológico necessária a todas as etapas do presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nematoides

Os nematoides são organismos pertencentes ao reino Animalia, sendo pseudocelomados, não segmentados, de simetria bilateral, ovíparos, dioicos (fêmeas e machos) e com sistema digestivo e reprodutivo completos. Esses organismos são os mais abundantes dentre todos os animais multicelulares (Cares *et al.*, 2006).

De acordo com Barker (1998), existe mais de 15000 espécies descritas, representando somente uma pequena porção dentro do filo Nematoda. Geralmente é dotado de uma estrutura tubular alongada, medindo em média 0,1 a 4,0 mm de comprimento. A maioria desses organismos é de vida livre, porém alguns são parasitas de órgãos subterrâneos de plantas (raízes, rizomas, tubérculos, bulbo e fruto hipógeo) (Ferraz & Monteiro, 1995; Moura, 1997).

Adicionalmente, estes organismos possuem uma camada protetora conhecida como cutícula que envolve todo o corpo, a qual pode ser lisa ou anelada quando vista ao microscópio óptico. Os nematoides fitoparasitas, tanto os ectoparasitas como os endoparasitas apresentam estilete, que é uma estrutura alongada e fina usada para romper a parede celular das plantas facilitando, assim, a ingestão de alimentos, uma condição necessária mas não suficiente para o parasitismo.

Estima-se que os nematoides sejam responsáveis por redução anual de até 12, 3% da produção agrícola mundial, o que representa cerca de 80 bilhões de dólares por ano em diferentes culturas de interesse econômico, como o algodão, soja, café e feijão (Jones & John *et al.*, 2013; Santos *et al.*; 2018; Vaz, 2018).

Dentre as diversas espécies destacam-se as do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1892 pertencente ao Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem

Tylenchina, da Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006; Cepulité *et al.*, 2018).

2.2. *Meloidogyne incognita*

Atualmente, o gênero *Meloidogyne* apresenta mais de noventa espécies e um vasto espectro com mais de 5000 espécies de plantas hospedeiras representando assim, uma ameaça à produção agrícola (Santos, 2011; Khan *et al.*, 2017; Cepulité *et al.*, 2018).

Dentre as espécies do nematoide das galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, *M. incognita* é considerada uma das espécies mais expressivas quanto às perdas econômicas no Brasil e no mundo, sendo o mais polífago com o parasitismo mais evoluído dentre os fitonematoides e de difícil controle (Trudgill & Blok, 2001; Agrios, 2005; Cepulité *et al.*, 2018).

O corpo de *M. incognita* é coberto por camada protetora denominada cutícula, dividido em região cefálica, onde encontram-se os lábios, os anfídeos com os receptores químicos, as papilas cefálicas e labiais com os receptores tácteis, a boca conhecida como estoma e o estomatoestilete, região mediana, onde é observado o esôfago, o intestino e o sistema reprodutivo, a região caudal, onde se localizam os fasmídeos (órgãos sensoriais), receptores tácteis, ânus na fêmea, a cloaca, os espículos e bursa no macho (Cares *et al.*, 2006).

2.3. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *M. incognita*, dependendo da hospedeira e dos fatores ambientais pode variar em média de 20 a 28 dias (Agrios, 2005; Abad *et al.*, 2009). As fêmeas maduras

fazem a postura de ovos na região cortical da raiz parasitada, estando estes envoltos por massa gelatinosa protetora, produzida nas glândulas retais e composta por glicoproteínas.

O acúmulo dos ovos nos tecidos da raiz faz com que parte dos mesmos sejam projetados para a superfície da raiz. No ovo é formado o juvenil de primeiro estágio (J_1), o qual passa pela primeira ecdise, ainda no ovo, e se transforma em juvenil de segundo estágio (J_2) estágio infectivo de *Meloidogyne* spp. (Cepulité *et al.*, 2018). O J_2 rompe a parede do ovo por ação mecânica do estomatoestilete e é auxiliado também pela produção e liberação de enzimas que enfraquecem a parede do ovo, como as quitinases. Sendo o único estágio móvel, os J_2 penetram nas raízes pela região meristemática, migrando intercelularmente até a zona de alongação em direção ao cilindro vascular. Após atingi-lo, cada J_2 induz o desenvolvimento de células nutritoras conhecidas como células gigantes, tornando-se sedentário (Cepulité *et al.*, 2018). Os estádios J_3 e J_4 são formados após a alimentação do J_2 nas células gigantes, apresentam formato salsichoide e são desprovidos de estilete. Os estádios J_4 são conhecidos como pré-adultos, fêmea ou macho. As fêmeas têm formato periforme e os machos vermiformes. Devido à reprodução partenogenética mitótica na maioria das espécies, as fêmeas são formadas em maior quantidade que os machos (Moura, 1997; Moura, 2017; Williamson & Hussey, 1996; Abad *et al.*, 2003).

Portanto, em condições normais, a maioria dos adultos formados é fêmea, enquanto os machos são produzidos sob condições desfavoráveis. Entende-se como condição desfavorável ao desenvolvimento de fêmeas, a elevada população de nematoides na raiz, resistência da planta hospedeira ao nematoide ou estado avançado de degradação dos tecidos da raiz. Nessas condições, juvenis que iriam se desenvolver em fêmeas podem tornar-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Esse fenômeno é conhecido por reversão sexual e favorece as poucas fêmeas do nematoide uma vez que os machos

quando formados migram para o solo, reduzindo a taxa de infecção da raiz (Abad *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2006).

O processo de alimentação de *M. incognita* em plantas hospedeiras é precedido da injeção de secreções, produzidas nas glândulas esofágicas do nematoide, para o interior das células das raízes. As glândulas esofágicas estão localizadas no pós-corpo do esôfago em nematoides fitoparasitas. *M. incognita* apresenta três glândulas esofágicas, sendo uma dorsal, uma subventral anterior e uma subventral posterior. As glândulas subventrais são mais exigidas nos primórdios do parasitismo, ou seja, por ocasião da penetração e migração de formas J₂. Por outro lado, a glândula esofágica dorsal é mais exigida na formação e manutenção das células nutridoras (Caboni, *et al.*, 2014).

Fatores como temperatura, umidade, planta parasitada, entre outros influenciam na duração do ciclo biológico. Para *M. incognita*, o ciclo de vida se completa em média de 28 dias, em temperaturas próximas a 28 °C e em plantas suscetíveis (Moura, 1997). Vale ressaltar que as plantas infectadas por este fitopatógeno tornam-se mais sensíveis a qualquer alteração ambiental, como o calor, o frio, a seca e aos ataques de pragas e outros patógenos (Bakhetia *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2008).

2.4. Métodos de controle

O fitonematoide *M. incognita* tem atraído atenção especial, pois representa definitivamente um grande desafio para a agricultura mundial. No Brasil, os danos infligidos pelo referido patógeno às culturas economicamente importantes como algodão, soja, cana-de-açúcar e café também representam perdas econômicas bastante acentuadas (Sikora & Fernandez, 2005; Perry *et al.*, 2009).

O controle desse fitoparasita pode ser realizado por métodos culturais por intermédio da rotação de culturas com plantas antagonistas, plantas armadilhas ou não hospedeiras e cultivares resistentes. O manejo de *M. incognita* em campo também envolve o uso de produtos biológicos (fungos e bactérias), solarização além de nematicidas sintéticos (Williamsom & Kumar, 2006; Wiratno *et al.*, 2009; Dinardo-Miranda, 2010).

De acordo com a literatura, extrato de plantas antagonistas contém compostos de diferentes classes químicas como os ácidos carboxílicos, alcaloides, terpenos, taninos, aminoácidos que apresentam efeitos nematostático e/ou nematicida (Ferraz & Freitas, 2004; 2008; Rocha *et al.*, 2017).

Canavalia ensiformis (L.) DC. (feijão de porco), *Mucuna aterrina* (Piper & Tracy) Holland. (mucuna preta), *Azadirachta indica* A. Juss (nim), *Crotalaria* spp., *Tagetes* spp., (cravo de defunto) e gramíneas forrageiras (família Poaceae) são alguns exemplos de plantas antagonistas utilizadas no controle de *M. incognita* (Ferraz & Freitas, 2000; Ferraz & Freitas 2008; Dufour *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2017).

Crotalaria spectabilis Rhot. e *Canavalia ensiformis* liberam no solo compostos de ação nematicida como monocrotalina (Honório Junior *et al.*, 2010). Segundo Kabana e colaboradores (2002) esses compostos reduziram população de *M. incognita* em condições de casa de vegetação e campo. *C. paulinia*, *C. ochroleuca* também possui capacidade de reduzir populações de nematoides, os quais penetram nas raízes, porém não completam seu ciclo biológico, reduzindo a infestação do patógeno na área de cultivo (Osei *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2017). Algumas delas abrigam bactérias capazes de fixar nitrogênio da atmosfera e todas fornecem expressivos volumes de matéria orgânica, aumentando a atividade de fungos antagonistas e melhorando as características gerais do solo (Ferraz & Freitas, 2008). Substâncias químicas com efeito nematicida têm sido isoladas de algumas dessas plantas e produtos naturais já estão surgindo no mercado (Rocha *et al.*, 2017).

Em relação à utilização de variedades resistentes, em especial no caso de nematoides, são poucos os materiais disponíveis para o agricultor e mesmo assim, a resistência geralmente é direcionada a uma ou poucas espécies de nematoides considerados mais importantes ou mais agressivos causadores de maiores perdas a determinadas culturas (Williamson & Kumar, 2006; Ferraz & Freitas, 2008).

O controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação aos agentes químicos promovendo a redução de formas móveis de nematoides e de ovos pela ação de outros organismos vivos que ocorrem naturalmente no solo ou introduzidos por meio da manipulação do ambiente pela ação do homem, como fungos e bactérias (Howell, 2003; Khan & Kim, 2007; Sahebani & Hadavi, 2008).

Existem mais de 200 tipos diferentes de organismos naturais considerados inimigos potenciais dos fitonematoides. Cerca de 75% dos antagonistas encontrados são fungos, os quais atuam como parasitas e antagonistas. As espécies parasitas atuam em ovos, juvenis, adultos e as antagonistas pela produção e liberação de substâncias tóxicas aos nematoides (Soares, 2006). Segundo o mesmo autor, já são conhecidos cerca de 160 espécies de 70 gêneros de fungos nematófagos que usam nematoides como fonte principal de alimentação. Estes fungos podem ser classificados em ectoparasitas ou predadores e capturam nematoides usando hifas como forma de armadilha como *Pochonia chlamidosporia* (Goddard) Zare e Gams (Ferraz & Santos, 1995; Stirling, 1991; Sharon, 2001; Soares, 2006).

Fungos antagonistas são agentes de controle biológico com potencial para interferir nos processos vitais de fitopatógenos. Desta forma, o ambiente ocupado por esses agentes antagonistas favorece o controle biológico, pois neste local podem competir por nutrientes e espaço com os patógenos, bem como produzir substâncias tóxicas a estes organismos, além de induzir a planta a desenvolver resistências às doenças (Stirling, 1991).

Atualmente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o uso de fungos antagonistas visando o controle do nematoide das galhas, gênero *Meloidogyne*, dentre eles, podemos citar o uso de *Purpureocillium lilacinum*, (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson, *Arthrobotrys monacrosporium* C. e mais recentemente, o uso de *Trichoderma* spp. Os fungos *Purpureocillium lilacinum* e *Arthrobotrys monacrosporium* são conhecidos por sua ação parasitária sobre ovos, fêmeas e juvenis de *Meloidogyne* spp., atuam por meio de seus conídios, cujas hifas germinativas penetram por aberturas naturais presentes na cutícula dos nematoides, colonizando-os e consumindo o conteúdo interno. Estão entre os fungos ectoparasitos mais comumente encontrados em solos do Brasil (Jacobs, 2002).

O uso de *Trichoderma* Pers. já foi relatado por vários autores no controle de nematoides do gênero *Meloidogyne*, agindo diretamente nos ovos e juvenis pelo aumento da atividade de quitinases e proteases, que promovem a degradação da parede celular dos ovos e a indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Sahebani & Hadavi, 2008).

Borges e colaboradores (2013) observaram que houve uma diminuição do número de ovos e juvenis de *M. incognita* no solo em feijoeiro, além da redução do número de galhas. Sharon e colaboradores (2001) e Ferreira e colaboradores (2008) concluíram que algumas espécies desse gênero parasitaram ovos de *M. exigua* Göldi, 1892 e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949.

Trichoderma harzianum Rifai e *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, Sydowia, são amplamente usados em cultura de soja, por exemplo, para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Esta atividade vem sendo estudada devido a produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de fungos, tais como quitinases, β -1,4-glucanases e proteases (Corabi-Adell & Lucon, 2002).

Fungos oportunistas podem também parasitar ovos e cistos. Esta estratégia de controle apresenta alguns benefícios, pois os agentes não são contaminantes, não causam desequilíbrio

ao meio ambiente, não deixam resíduo, possuem baixo valor comercial e são de fácil aplicação. Contudo, o controle biológico ainda é uma das alternativas com poucos estudos realizados em campo (Stirling, 1991; Soares, 2006).

A solarização é um método de controle físico com base na utilização da luz solar para o aumento da temperatura do substrato a ser tratado, como forma de suprimir populações de nematoides. Esse método pode ser aplicado no tratamento de substrato para a propagação de mudas ou no campo logo após a colheita, onde o solo é coberto com lona plástica, ficando exposto à luz solar com aumento da temperatura. Essa estratégia é mais utilizada em áreas pequenas como, por exemplo, aquelas utilizadas no cultivo de hortaliças. Nas regiões de clima mais quente, o solo é removido, exposto por até 20 dias, e, após essa exposição, um novo plantio é realizado (Oslen, 2000).

O manejo integrado de pragas é uma estratégia bastante almejada, porém necessita de planejamento rigoroso, de gestão intensiva da cultura, com maior dispêndio de tempo e pode ter custos superiores ao uso de defensivos agrícolas (Gentz, 2010).

Dentre as estratégias supracitadas, a aplicação de nematicidas sintéticos tem sido o método predominantemente utilizado por muitos anos contra esses fitopatógenos (Noling, 2002; Ferreira & Viana, 2016). No entanto, nas últimas décadas, o impacto severo causado por esses produtos químicos sobre a saúde humana, animal e meio ambiente tem promovido profundas preocupações (Risher *et al.*, 1987; Zuckerman & Esnard, 1994; Haydock *et al.*, 2006; Elbadri *et al.*, 2008).

De acordo com relatos na literatura, a utilização prolongada e excessiva de nematicidas sintéticos podem promover carcinogênese humana, evolução mais rápida de indivíduos resistentes, a destruição de inimigos naturais, transformação de espécies anteriormente inócuas em patogênicas, danos a espécies não-alvo e contaminação das fontes de água e alimentos. Adicionalmente, foi relatado que o uso destes químicos pode causar desequilíbrio

ecológico em áreas de plantas nativas e de espécies animais (Chitwood, 2002; Phillips & Bode, 2004; Berny, 2007; Mariyono, 2008; Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Abdel-Dayem *et al.*, 2012; Cepulité *et al.*, 2018).

Como resultado, os nematicidas convencionais tem sido proibidos ou restritos de serem utilizados, limitando essa alternativa. De fato, nos últimos anos, mudanças significativas ocorreram na lista de agrotóxicos legalmente comercializados na União Europeia (Diretiva 91/414/CEE) e cerca de 704 substâncias ativas foram abolidas do mercado (Karabelas *et al.*, 2009). Adicionalmente, a EPA (Environmental Protection Agency) nos EUA também decidiu aumentar o controle dos registros de agrotóxicos e do nível de tolerância que seja seguro para saúde humana e para o ambiente (EPA, 2013). Ainda em 2009, a União Europeia definiu novas regras visando reduzir os riscos e os impactos do uso de agrotóxicos (Diretiva 2009/128/CE) (EC, 2013). Assim, a restrição ao uso de químicos sintéticos em culturas agrícolas é uma realidade mundial (Caboni & Ntalli, 2012).

Conseqüentemente, os nematicidas convencionais tais como 1,2-dicloropropano-1,3-dicloropropeno (DD), 1,2-dibromo-3-cloropropano - (DBCP) e brometo de metila foram banidos do mercado devido à sua volatilidade à camada de ozônio (Slutsky *et al.*, 1999; Chitwood 2002; Schneider *et al.*, 2003). Nematicidas não fumigantes do grupo dos organofosforados e os organo carbamatos estão na lista de produtos químicos que não devem ser utilizados como nematicidas no campo, especialmente para culturas do grupo das hortaliças e fruteiras (Haydock *et al.*, 2006).

Pelos motivos expostos acima, grande parte dos nematicidas convencionais têm sido proibidos ou tiveram o seu uso restrito. Portanto, há o interesse no desenvolvimento de métodos de controle de nematoides que sejam mais seguros para o meio ambiente e à saúde humana. Neste cenário, o conceito de sustentabilidade baseado em química verde tem avançado rapidamente, permitindo a introdução de novos produtos e processos visando

substituir os agroquímicos convencionais atualmente disponibilizados no mercado por aqueles cujo compostos químicos sejam oriundos de vegetais (Singh & Prasad, 2014).

Diversos constituintes químicos com efeito nematicida já foram isolados de espécies vegetais, como é o caso de espécies de brássicas, que produzem compostos sulfurados, os glicosinolatos (Lewis & Papavizas, 1971), incluindo isotiocionatos, nitrilas, tiocianatos e epinitrilas (Mayton *et al.*, 1996), capsaicina, capsaonoides e alil isotiocianato (Freitas *et al.*, 2000), terthienyl e derivados de bithienyl isolados de *Tagetes* spp. (Singh & Prasad, 2014), .

Plantas do gênero *Mucuna* são utilizadas no controle de nematoides na forma de extratos ou sob a forma de tortas aplicadas diretamente ao solo (Ferraz & Freitas, 2000). Esse gênero se caracteriza por possuir compostos fenólicos, fitatos, saponinas além da L-dopa que atua diretamente no sistema nervoso central, além de sua utilização no tratamento de doenças humanas, como doença de Parkinson (Manyam *et al.*, 2004, Longhi, 2007). O efeito nematicida de mucuna, quando usada em rotação com culturas comerciais, é bem conhecido, embora ela mesma não seja imune a várias espécies de nematoides (Ferraz & Freitas, 2000). *Tagetes patula* , *T. erecta* e *T. minuta* L., são também utilizadas também no controle de nematoides como *Meloidogyne* e *Prathylenchus*.

Outra espécie de planta *Azadirachta indica* (popularmente conhecida como nim), vem sendo utilizada para o controle de fitonematoides sob a forma de extratos foliares aplicados ao solo, cobertura do solo com folhas secas ou frescas, exsudados radiculares, cobertura de sementes com óleo ou extratos e no tratamento de raízes sob a forma de mergulho em extratos foliares, sendo esta técnica bastante utilizada em algumas culturas como tomate, berinjela, couve-flor e pimenta, apresentando resultados significativos no controle de *M. javanica*, *M. incognita*, *Rothylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, dentre outros nematoides (Ferraz & Freitas, 2000; Murugesan & Murugesan, 2008).

A maior parte dos trabalhos sobre o uso de nim no controle de fitonematoides está centrado na utilização de tortas resultantes do processamento das sementes, em incorporação ao solo. Formulações de pesticidas à base de nim têm sido desenvolvidas nos Estados Unidos, na Índia e em outros países, principalmente para uso como inseticidas (Margosan-O, Nimbecidine, Neemgold, Neemazal, Neemax, Fortune Aza, Neemix, Achook, Neemrich, Neemark, Econeem, Rakshak, Repelin, Welgrow, Azatin, Turplex, Align, Bioneem, Benefit e outros). Alguns destes produtos têm mostrado boa atividade nematicida. O efeito de nim contra nematoides, provavelmente, é devido a presença de várias substâncias químicas, tais como azadirachtin, nimbin, salannin, nimbidin, kaempferol, thionemone, quercetin e outros (Ferraz & Freitas, 2000; Singh & Prasad, 2014).

2.5. Agrotóxicos

Agrotóxicos são definidos de acordo com a legislação brasileira como produtos químicos, físicos ou biológicos ou um agente biológico, como vírus ou bactéria utilizados na agricultura. São genericamente conhecidos como agrotóxicos, agroquímicos, defensivos agrícolas, praguicidas, biocidas, desinfestantes ou produtos fitossanitários destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989; MAPA).

Dentre os termos utilizados, agrotóxico é o termo aceito pela legislação brasileira, artigo 2º, da Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989, porém não é utilizado por nenhum outro país ou organização internacional que trata do tema. No entanto é aceito pela legislação brasileira, artigo 2º, da Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989. A Comissão do Codex Alimentarius,

organização internacional de referência para alimentos no acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio (OMC), utiliza o termo em inglês e francês “pesticide” e em espanhol “plaguicida”. Dessa forma, o termo agrotóxico será substituído por pesticidas de forma a alinhar a legislação brasileira às práticas internacionais (MAPA, 2018).

Entre os agrotóxicos, estão incluídos os desfolhantes, os dessecantes e as substâncias reguladoras do crescimento vegetal ou fitoreguladores, os fertilizantes sintéticos, os hormônios e outros agentes químicos do crescimento, os fungicidas, os inseticidas, os bactericidas, os acaricidas, os rodenticidas (Lei n. 7.802/1989; Ribas & Matsumura, 2009).

Com a crescente competição por alimentos entre o homem e outros seres vivos, uma das formas encontradas pelo homem foi a utilização de produtos para controlar pragas, doenças, ervas daninhas, com o intuito de aumentar os alimentos necessários à população. Desde a época romana, já se usavam a fumaça proveniente da queima do enxofre no controle de pulgões que atacavam as plantações de trigo, além do uso do sal como controle de ervas daninhas (Chaim, 1999; Ferreira, 2015; Ferraz & Brown, 2016) .

O isolamento das primeiras substâncias do Reino Vegetal foi realizado nos séculos XVIII e XIX, resultando no isolamento da morfina, quinina, estriquinina e nicotina, rotenona e a piretrina. Tais substâncias apresentam grande importância química, terapêutica e econômica até os dias atuais (Pinto *et al.*, 2002; Corrêa, 2015).

Em 1865, foi descoberto a mistura conhecida como Verde-Paris, uma mistura à base de arsênio e cobre, um dos primeiros inseticidas sintéticos inorgânicos a ser utilizado. Esse composto começou a ser comercializado em 1814 como pigmento para tintas, cor verde. Após envenenamento de pessoas por utilizarem tintas que continha o pigmento verde em quadros, esse composto foi banido completamente (Chain, 1999).

Em 1867, o Verde-Paris foi inserido no combate ao besouro da batata do Colorado. Por ser altamente tóxico, foi banido no ano de 1900. Millardet, em 1881, descobriu a mistura "Bordeaux", sulfato de cobre e cal, um excelente fungicida para controle do míldio da videira- *Plasmopora viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni. Essa mistura até os dias atuais é bem utilizada como controle de doenças em várias culturas.

Os primeiros herbicidas surgiram na década de 1940, com a redescoberta do DDT (diclorodifeniltricloroetano) e toda a gama de organoclorados.

A partir da década de 1960, com a Revolução Verde, houve a massificação da utilização dos pesticidas, tal prática levou a adoção de técnicas agrícolas baseadas no uso intensivo de produtos químicos e instrumentos mecânicos, levando os agricultores a produzirem mais nas mesmas dimensões de áreas e expandindo a produção para áreas não cultiváveis (Chaim, 1999; Albergoni *et al.*, 2000; Ferreira, 2015).

O uso incorreto e indiscriminado de diversos pesticidas durante várias décadas levou ao acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, contaminação da água e do solo, intoxicação de produtores rurais, aparecimento de pragas resistentes, o interrompimento do sistema de controle biológico por inimigos naturais, ocasionando surtos de insetos praga, entre muitos outros problemas (Kim *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2004; Menezes, 2005; Corrêa & Salgado, 2011).

Os inseticidas botânicos foram muito importantes entre as décadas de 30 e 40, tendo o Brasil como sendo um grande produtor e exportador destes produtos, apresentando substâncias como piretro, rotenona e nicotina. Tais substâncias retrata maior segurança no uso agrícola e menor impacto ambiental (Menezes, 2005; Corrêa & Salgado, 2011).

Os inseticidas naturais foram gradativamente substituídos pelos sintéticos, pois apresentavam problemas como variações na eficiência devido a diferenças na concentração do

ingrediente ativo entre plantas e baixo efeito residual, que obrigava a se fazer várias aplicações em períodos curtos (Corrêa & Salgado, 2011).

Segundo Pimentel (1995), menos de 0,1% dos pesticidas aplicados nas culturas para o controle de pragas atingem os alvos, os demais vão ser dispersos a outros lugares não alvo no meio ambiente, afetando a saúde pública, a biota benéfica presente na rizosfera, bem como a água e a atmosfera do ecossistema. O autor exemplifica afirmando que tecnologias aprimoradas de aplicação podem melhorar a eficiência no uso de pesticidas e proteger a saúde pública e o meio ambiente, destacando que a deriva decorrente da aplicação aérea de agrotóxicos já atingiu uma distância de 32 km da distância alvo.

A preocupação com o uso de agrotóxicos no meio ambiente e com a saúde humana teve início na década de 1960, causando efeitos ambientais não intencionais, uma vez que não são tão seletivos para os organismos alvo (Gomes, 1962; Ferreira, 2015).

O Brasil ocupa atualmente uma posição de destaque quando o assunto é a produção agrícola. O modelo agrícola adotado no País, entretanto, está fortemente vinculado ao uso de agrotóxicos, sendo a agricultura brasileira modelo de desenvolvimento voltado a ganhos de produtividade (Ferreira, 2015).

Nesse cenário, os impactos ocasionados ao meio ambiente e à saúde humana têm sido negligenciados. A contaminação dos recursos ambientais passa a ser uma realidade ameaçadora da qualidade de vida das gerações presentes e futuras. Uma das formas de utilização de agrotóxicos ainda em vigor no Brasil, apesar dos enormes impactos para o meio ambiente e para a saúde humana, consiste na aplicação aérea desses produtos (Gomes, 1962; Ferreira, 2015; Halfed-Vieira *et al.*, 2016).

Ferreira (2015), em seu trabalho citou que a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) apresentou estudos que comprovam a alta periculosidade da pulverização aérea. Segundo o autor, a empresa afirmou que, normalmente ocorre uma

“deriva técnica”, de maneira que os atuais equipamentos de pulverização - mesmo com calibração, temperatura e ventos ideais - deixam 32% dos agrotóxicos pulverizados retidos nas plantas; outros 49% vão para o solo e 19% vão pelo ar para outras áreas circunvizinhas da aplicação.

Estima-se que as pragas agrícolas e outros patógenos destroem cerca de 10% a 40% da produção agrícola bruta no mundo (Pretty, 1999; Ferreira, 2015). Os danos ocasionados por patógenos podem resultar no aumento dos preços dos alimentos, bem como no aumento da dependência de produtos importados.

Portanto, há uma necessidade permanente para o desenvolvimento de novos métodos de controle de pragas e patógenos, que sejam mais seguros para os agricultores, consumidores e para o meio ambiente. Neste cenário, o conceito de sustentabilidade baseado em química ambiental e/ou química verde tem avançado rapidamente, permitindo a introdução de novos produtos e processos visando substituir os agroquímicos convencionais atualmente utilizados por nematicidas naturais.

2.6. Extratos vegetais

Extratos são preparações concentradas, misturas complexas constituídas de diversas classes químicas de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais obtidos a partir de matérias-primas vegetais secas e / ou verdes que passaram ou não por tratamento prévio (inativação enzimática, moagem, etc) e preparadas por processos envolvendo algum tipo de solvente (Clarke, 1985; Marques, 2005).

O processo de separação desses produtos naturais bioativos corresponde a três fases principais: extração a partir do material vegetal, fracionamento do extrato ou óleo e purificação do princípio ativo (Clarke, 1985; Marques, 2005).

O processo de extração consiste em retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida no material vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros. Vale ressaltar que os extratos e seus métodos de obtenção foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica (Poirot *et al.*, 2006).

2.7. Metabolismo vegetal

De um modo geral, o metabolismo vegetal pode ser subdividido em duas categorias denominadas metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário pode ser associado a compostos como os carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os mesmos apresentam função metabólica essencial para vida como, por exemplo, crescimento, desenvolvimento, manutenção das células, reprodução e fotossíntese e estão amplamente distribuídos, sendo precursores para os metabólitos secundários (Croteau *et al.*, 2000; Dixon, 2001; Nass, 2007; Corrêa, 2015).

Já os metabólitos secundários são, em princípio, substâncias de natureza química diversa, as quais não estão vinculadas com as funções celulares vitais (Chitwood, 2002; Dixon, 2011; Ntalli & Caboni, 2012). Mais de 50 mil metabólitos secundários já foram identificados em espécies de angiospermas e são sintetizados em diferentes compartimentos celulares, por quatro vias de biossíntese. Por meio destas vias são formados os três principais grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Croteau *et al.*, 2000; Corrêa, 2015).

Vale destacar que os metabólitos secundários atuam como importantes atrativos ou repelentes de polinizadores, proteção contra radiação UV e poluição, na sinalização intraespecífica, na alelopatia, dentre outras funções (Croteau *et al.*, 2000; Dixon, 2001; Nass,

2007; Silva, 2010; Corrêa, 2015). Contribuem também para a adaptação das espécies e sua sobrevivência, apresentam diversas funções e aplicações e não possuem distribuição universal entre os vegetais, sendo alguns específicos a determinados vegetais (Ntalli & Caboni, 2012).

Os metabólitos secundários têm grande valor agregado do ponto de vista econômico. Primeiramente, porque de todos os compostos identificados, poucos são utilizados como drogas, saborizantes, fragrâncias, inseticidas ou corantes. Além deste valor econômico real e efetivo, eles apresentam grande potencial como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos/fumigantes/inseticidas, uma vez que a biodiversidade é fonte de recursos para o desenvolvimento de novos compostos (Croteau *et al.*, 2000; Dixon, 2001; Silva, 2010; Corrêa, 2015). O metabolismo secundário também produz substâncias químicas que podem apresentar atividade nematicida (Chitwood, 2002; Singh & Prasad, 2014), como a azadiractina, salanina, nimbina, desacetilnimbina, saponinas, ácidos lantônicos, entre outros (Ntalli & Caboni, 2012).

2.8. Classe de compostos vegetais

2.8.1. Terpenos

Os terpenos formam o maior grupo de produtos naturais, apresentando uma grande diversidade estrutural, com mais de 35 mil substâncias identificadas. Eles são derivados teóricos do isopreno, uma estrutura de 5 carbonos, sendo o número dessa unidade presente na molécula utilizada para a classificação, podendo existir: monoterpenos (C₁₀, piretróides e óleos essenciais), sesquiterpenos (C₁₅, lactonas), diterpenos (C₂₀, taxol), triterpenos (C₃₀, esteróides, saponinas), tetraterpenos (C₄₀, carotenóides) e politerpenos (mais de 40 carbonos, borracha) (Seigler, 2000; Corrêa, 2015).

Os constituintes terpênicos podem apresentar diversas funções orgânicas, como álcoois, cetonas, éteres, ésteres e aldeídos. Os terpenos possuem, também, diversas funções nas plantas atuando como fitoalexinas, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, inseticidas ou repelentes, hormônios vegetais, moléculas de sinalização e aleloquímicos (Silva, 2010; Silva *et al.*, 2017).

2.8.2. Compostos fenólicos

O grupo dos compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual houve ao menos um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila. Esses compostos podem ocorrer naturalmente na forma livre (agliconas), ligados a açúcares (glicosídeos) ou, ainda, ligados a proteínas, terpenos, entre outros. Ácidos fenólicos, quinonas, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas são exemplos de compostos fenólicos (Seigler, 2000; Peres, 2010).

As cumarinas, furanocumarinas e estilbenos, exemplos de classes de substâncias fenólicas, protegem as plantas contra patógenos (bactérias e fungos) e herbívoros, além de inibirem a germinação de sementes de plantas adjacentes impedindo a competição dessas pelos mesmos recursos, processo conhecido como alelopatia. Exemplos de compostos fenólicos com ação alelopática são o ácido caféico e o ácido ferúlico (Peres, 2010).

Os compostos fenólicos não são apenas atrativos para os animais, mas também para os humanos. Alguns compostos como o aldeído cianâmico presente na canela (*Cinnamomum zeyllanicum* Blume.) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews.), são empregados na indústria de alimentos. Os taninos protegem várias plantas contra herbívoros (Feeny, 1976) e são tóxicos para uma ampla gama de fungos, bactérias e leveduras (Scalbert, 1991). Seu uso parece promissor para o controle de nematoides parasitas de plantas em agricultura sustentável, no entanto, são sugeridos outros estudos para investigar o efeito dos

taninos em diferentes tipos de solos e espécies de diferentes nematoides (Maistrello *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos têm recebido crescente atenção por parte da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Uma vasta gama de efeitos fisiológicos são atribuídos a eles como, por exemplo: antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antitrombóticos, antioxidantes, cardioprotetores e vasodilatadores. Em função destes efeitos, este grupo de substâncias, presentes em altos níveis em frutas e vegetais, é considerado benéfico à saúde humana, especialmente pelo potencial antioxidante (Silva, 2010).

Com mais de 4500 diferentes representantes conhecidos até o momento, os flavonoides constituem uma grande classe de fenólicos naturais, presentes na maioria dos tecidos vegetais, muitas vezes em vacúolos. Muitas das interações entre plantas e animais são influenciadas por flavonoides. As cores das flores e dos frutos muitas vezes servem de atração para animais polinizadores e dispersores de sementes. Adicionalmente, esse grupo é importante por proteger as plantas contra os raios UV (Tayz & Zeiger, 2004).

Além de sua importância na proteção das plantas contra fatores ambientais e bióticos adversos, acredita-se que os compostos fenólicos tenham sido fundamentais para a própria conquista do ambiente terrestre pelas plantas. Este é o caso da lignina, a qual proporciona o desenvolvimento do sistema vascular, dando rigidez aos vasos (Peres, 2010).

2.8.3. Alcaloides

Alcaloide é o nome dado a um grupo de substâncias bastante heterogêneo, predominantemente sintetizado por plantas (dos 27 mil alcaloides conhecidos no momento, 21 mil são de origem vegetal). Esta classe de compostos nitrogenados é reconhecida pelo seu

amplo espectro de atividades biológicas, por isto correspondem a princípios ativos comuns em plantas medicinais e tóxicas (Cabral & Pita, 2015; Rezende *et al.*, 2016).

Os alcaloides são compostos nitrogenados que atuam na defesa química contra herbívoros e na atração de polinizadores. As quatro classes mais importantes são: alcaloides, betalainas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (Cabral & Pita, 2015; Rezende *et al.*, 2016).

Alguns exemplos de alcaloides são a morfina, codeína e papaverina, originários da papoula (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae); a cafeína, originária do café (*Coffea arábica* L., Rubiaceae), encontrada também em folhas de cacau (*Theobroma cacao* L., Malvaceae) em concentrações mais baixas, a cafeína pode matar as larvas do verme do tabaco (*Manduca sexta* Cramer, 1779), cola (*Cola acuminata* Schott et End. Malvaceae), em folhas do chá mate (*Ilex paraguariensis* St. Il., Aquifoliaceae), pilocarpina, originária de folhas do gênero *Pilocarpus* Vahl: (jaborandi do maranhão) (Eich, 2008; Cabral & Pita, 2015).

O curare, extraído da espécie *Chondodendron tomentosum* Rui & Pav. (Menispermaceae), é um potente relaxante muscular com atividade anestésica, utilizado como veneno de flecha por indígenas sul-americanos. Outro alcaloide muito conhecido é a nicotina e anabsina, presente no tabaco (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae), um dos primeiros inseticidas usados pelos seres humanos que permanece como um dos mais eficazes. A espécie *Catharanthus roseus* L. contém mais de 100 tipos de alcaloides monoterpênicos indólicos, a vinblastina, por exemplo, um antineoplásico usado no tratamento da doença de Hodgkin e outros linfomas (Croteau *et al.*, 2000; Rezende *et al.*, 2016).

Os diferentes tipos de alcaloides são classificados de acordo com o aminoácido precursor utilizado para a síntese de sua estrutura e o anel nitrogenado formado a partir deste, sendo que os aminoácidos mais comuns são os alifáticos, como a lisina e a ornitina, os

aromáticos, como a tirosina e o triptofano. A partir da lisina são biossintetizados os alcaloides quinolizidínicos, compostos tóxicos para herbívoros, encontrados em Berberidaceae, Ranunculaceae, Solanaceae e em Fabaceae, como *Lupinus* spp., que contém a lupinina. Os alcaloides indolizidínicos, comuns em fabáceas, possuem alta atividade anti-HIV. Os alcaloides isoquinoleicos, oriundos de plantas da família Papaveraceae, sendo os mais comuns (morfina, codeína, papaverina, tebaína, noscapina, narceína) são utilizados amplamente como terapêuticos desde a antiguidade (Eich, 2008; Cabral & Pita, 2015; Rezende *et al.*, 2016).

2.9. Substâncias vegetais bioativas

De modo geral, em decorrência do surgimento de novas doenças e organismos fitopatogênicos, as plantas desenvolveram substâncias que são verdadeiros inseticidas e fungicidas naturais como forma de sobrevivência e manutenção da espécie. Essa capacidade natural das plantas foi bastante explorada na agricultura antes da Segunda Guerra Mundial, sendo então gradualmente substituídos por produtos sintéticos (Peres, 2010; Corrêa & Salgado, 2011).

Para satisfazer à demanda cada vez maior de alimentos, a revolução verde, datada da década de 1960, levou a agricultura a se caracterizar como monoculturas extensivas e de grande utilização de fertilizantes químicos sintéticos e agrotóxicos (Menezes, 2005). Apesar da utilização dessas substâncias terem contribuído para o aumento da produção agrícola, trouxe também muitos males à saúde humana (Corrêa & Salgado, 2011).

Estudos utilizando extratos vegetais e óleos no controle de fitonematoides tem ganhado atenção por diversos pesquisadores em todo o mundo, sendo os alvos de estudos baseado nos metabólitos secundários e componentes químicos oriundos de vegetais para o controle do

nematoide, os quais apresentam menos riscos tanto à saúde humana bem como a manutenção do equilíbrio ecológico (Ferris & Zeng, 1999; Chitwood, 2002).

Atualmente, com a crescente preocupação com o meio ambiente e com a saúde humana, a matéria prima utilizada nas indústrias químicas tem conduzido a uma substituição por produtos naturais (Dixon, 2011; Caboni & Ntalli, 2012). Durante a última década, os fitoquímicos receberam uma crescente atenção devido à sua importância biológica e com potenciais efeitos para a saúde humana, como os antioxidantes, os anticancerígenos, antienvhecimento, antiaterosclerótico, atividades antimicrobianas e atividades antiinflamatórias (Khan *et al.*, 2017).

O uso de extratos vegetais no controle de fitomoléstias apresenta vantagens em relação aos pesticidas sintéticos (Quarles, 1992; Gardiano, 2006), tais como: os alvos não possuem capacidade de inativar os compostos químicos derivados dos vegetais, são menos tóxicos a outros animais e aos seres humanos, além de serem biodegradados com facilidade. Tais compostos podem ser isolados, identificados e sintetizados quimicamente por indústrias ou podem ser aplicados diretamente pelos agricultores (Giardano, 2006).

Atualmente, existem vários compostos conhecidos de aplicações com ação inseticida ou ação antipatógenos. Como exemplos de inseticidas naturais, tem os rotenoides, a nicotina, rotenona, cevadina, veratridinae, azadiractina, e biopesticidas voláteis. Estes últimos são, normalmente, óleos essenciais presentes nas plantas aromáticas, cada um com diferente espectro de ação (Prakash & Rhao, 1948; Isman, 2000).

Os rotenoides impedem a regeneração de NAD^+ , diminuindo o consumo de O_2 , levando insetos à morte. A nicotina é conhecida por ser um inibidor da acetil colina esterase, fazendo com que insetos morram por convulsão. Outro produto natural conhecido por inibir a acetil colina esterase é a fisostigmina presente no feijão-de-calabar (*Physostigma venenosum* John Hutton Balfour).

A azadiractina é uma substância presente no nim e em outras plantas como a *Melia azedarach* L. Substância bastante estudada e utilizada por possuir ação na interferência do funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo a ecdise. Além dessa função, essa substância é bastante utilizada no controle de nematoides do gênero *Meloidogyne*, tanto na forma de extrato vegetal ou como forma de torta, sendo aplicados no solo (Javed *et al.*, 2006; Baldin *et al.*, 2012). Outras espécies vegetais têm sido também estudadas no controle de nematoides com resultados promissores, como é o caso de *Chenopodium ambrosioides* L., *Ricinus communis* L., *Datura stramonium* L., (Mani & Chitra, 1989; Mashela *et al.*, 2002; Mello *et al.*, 2006).

Outra importante substância conhecida que atua nos processos de desenvolvimento de insetos são os precocenos (cromenos), atuam na indução antecipada da metamorfose em alguns insetos através da destruição da glândula que secreta os hormônios juvenilizantes (Mani & Chitra, 1989).

Com exceção dos rotenóides que atuam na respiração, todos os outros compostos naturais com ação inseticida atuam no sistema nervoso ou no sistema endócrino. Essa estratégia permite as plantas acumularem grandes quantidades desses metabólitos sem que elas próprias sejam prejudicadas (Giardano, 2006).

A utilização de nematicidas botânicos, de maneira geral, é uma estratégia mais segura para o homem, meio ambiente e inimigos naturais do que os nematicidas sintéticos. Nos últimos anos, substâncias bioativas tem se tornado alvo de estudos empregados no manejo integrado de pragas e de doenças, com menor impacto ao meio ambiente (Castro, 1989; Baldin *et al.*, 2012). Apesar de haver informações sobre grande número de plantas com atividade inseticida, fungicida e efeito nematicida, ainda falta o adequado desenvolvimento de produtos que possam ser disponibilizados comercialmente (Isman, 2000; Corrêa & Salgado, 2011).

O efeito de extratos botânicos sobre os fitonematóides e algumas plantas tem apresentado um grande potencial como matéria prima, promissor na produção de nematicidas naturais, sido descrito por Mani & Chitra (1989) e por Ferraz & Freitas (2000). As plantas nas quais encontram-se mais estudos relacionando ao preparo de extratos ou para a extração de óleos essenciais com propriedades nematicidas são: *Mucuna prurienses* (L.) DC., *Tagetes* spp. (cravo-de-defunto); *Crotalaria* spp. (sendo a *C. juncea* L. a mais estudada); *Azadirachta indica* A. Juss (nim); diversas espécies de *Poaceae* (gramíneas); *Ricinus communis* L. (mamona); brássicas e algumas plantas com características medicinais e aromáticas (Prakash & Rhao, 1978; Ferraz *et al.*, 2010).

Estudos realizados com *Acacia auriculiformis* Mill., identificaram a presença de duas saponinas triterpênicas com ação nematicida a juvenis de segundo estágio de *M.incognita* avaliados *in vitro* e *in vivo*, sendo avaliados também no solo, reduzindo significativamente a população do nematoide em raízes de feijão caupi (Prakash & Rhao, 1948).

Pandey (1995) relatou que pó das folhas de *Adhatoda vasica* N., adicionadas ao solo reduzem significativamente a multiplicação de *M.incognita*, além disso, Rodrigues-Kabana relatou a forte atividade fumigante nematicida de furfural contra *M. incognita*, quando testado em condições *in vitro*.

Azolla pinnata é uma alga azul comumente encontrada em campos de arroz de baixa altitude na Índia, sendo que seus extratos de folhas estudados por Thaker (1988), mostraram toxicidade aos ovos de *M. incognita* e *M. javanica*. No ano anterior, Thakar e colaboradores encontraram um biofertilizante nas folhas dessa alga, o que poderia reduzir significativamente as infecções ocorridas por *M. incognita* em raízes de plantas de quiabo.

Rhode (1972) avaliou *Bocconia cordata* L. erva encontrada em zonas tropicais e subtropicais, onde alcaloides com propriedade nematicidas foram isoladas das raízes desta erva, querelitrina e bocconina, alcaloides, apresentando ação tóxica em *Rhabditis* sp.,

Panagrolaimus sp. Pó de café foi relatado por Mian & Rodriguez (1982) mostrando atividade nematicida contra *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949.

Maistrello (2010) e colaboradores, observaram *in vitro* um efeito nematostático de taninos provenientes de castanheira, enquanto que no experimento em vaso houve uma redução significativa de ovos e juvenis / g raiz. Adicionalmente, a densidade populacional total e as taxas de reprodução do nematoide foram registradas. Em pesquisa realizada por Naz (2012) e colaboradores, extratos de raiz e caule de *Fumaria parviflora* Lam., mostraram forte atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita* em experimentos *in vitro* e em plantas de tomateiro da cv. Rio Grande. Estudos fitoquímicos sobre *F. parviflora* revelaram a presença de vários metabólitos, dentre eles os taninos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, esteroides e triterpenóides (Rahman *et al.*, 1992).

Taninos são um grupo muito complexo de metabólitos secundários de plantas, com variada massa molecular e solúveis em solução polar (Silanikove *et al.*, 2001), que protege várias plantas contra herbívoros (Feeny, 1976) e são tóxicos para uma ampla gama de fungos, bactérias e leveduras (Scalbert, 1991). Seu uso parece promissor para o controle de nematoides parasitas de plantas em agricultura sustentável, no entanto, são sugeridos outros estudos para investigar o efeito dos taninos em diferentes tipos de solos e espécies de diferentes nematoides (Maistrello *et al.*, 2010).

Ainda que várias espécies de plantas tenham sido estudadas para o controle de nematoides (Eich, 2008; Ntalli & Caboni, 2012) considerando que a flora brasileira é muito rica, há muitas espécies a serem pesquisadas.

A família Solanaceae produz uma enorme diversidade de metabólitos secundários passíveis de serem estudados, inclusive para a proteção de culturas. Suas espécies são ricas em compostos biologicamente ativos, destacando o grupo dos alcaloides, os quais podem

causar efeitos nematotóxicos sobre fitonematoides, mesmo em pequenas doses (Ntalli & Caboni, 2012; Hassine *et al.*, 2013; Lima, 2017).

Devido aos males causados pela utilização em larga escala de agrotóxicos e inseticidas sintéticos, existe a necessidade de desenvolver novas tecnologias a fim de minimizar esta utilização. Além disso, há crescente interesse por produtos orgânicos, livres de agrotóxicos, bem como a conscientização de produtores e consumidores, levando-os a atitudes ecologicamente corretas. Todos estes aspectos impulsionam a busca por produtos alternativos que não agridam o meio ambiente. As plantas compõem rica fonte de pesquisa e muitos dos exemplares já estudados mostraram-se promissores no controle de diversos patógenos (Eich, 2008; Ntalli & Caboni, 2012; Singh & Prasad, 2014).

No entanto, para a inserção definitiva e segura de produtos botânicos no mercado, estudos sobre mecanismos de ação, fitotoxicidade, segurança a mamíferos e outros vertebrados, inocuidade sobre organismos benéficos presentes tanto na rizosfera, organismos presente nos lagos, rios e lagoas, pássaros, a estabilidade térmica entre outras características são necessárias de serem estudadas, com o objetivo de obter nematicidas à base de moléculas oriundas do metabolismo vegetal, nematicidas botânicos (Ferraz & Freitas, 2000; Corrêa & Salgado, 2011; Ntalli & Caboni, 2012; Singh & Prasad, 2014; Diaz, 2015).

2.10. Família Solanaceae

A família Solanaceae compõe um dos maiores grupos dentre as plantas vasculares (D'arcy, 1991; Hunziker, 2001), possui 106 gêneros e cerca de 3000 espécies, com distribuição cosmopolita, na qual a América do Sul é um dos principais centros de diversidade e endemismo (Eich, 2008; Pereira *et al.*, 2016). No Brasil, a família Solanaceae é constituída

por 31 gêneros e cerca de 500 espécies nativas, dessas 215 são relatadas como endêmicas (Soares, 2006; Pereira *et al.*, 2016).

Diversas espécies da família Solanaceae destacam-se apresentando uso alimentício, medicinal e ornamental, apontando grande importância comercial e econômica (Roddick, 1991; Hawkes, 1999). Várias destas plantas são conhecidas popularmente como "jurubebas" e muitas delas são amplamente utilizadas na medicina popular, especialmente em doenças de pele e doenças relacionadas ao fígado e ao baço (Pinto *et al.*, 2010). Representada no grupo vegetal das angiospermas, essa família é bem caracterizada, apesar da diversidade existente, é bioprodutora de sesquiterpenos e uma grande variedade de alcaloides, sendo eles: tropânicos, quinolizidínicos, indólicos, piridínicos, quinolínicos, esteroidais, pirrolizidínicos, piperidínicos, isoquinolínicos e alcaloides mistos (Dixon, 2001; Pereira *et al.*, 2016).

Entre todos os gêneros da família Solanaceae, o gênero *Solanum* é o maior e mais complexo. Estima-se que possua cerca de 1500 espécies e 5000 epítetos, os quais estão localizados nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a América do Sul o centro de maior diversidade. No Brasil, cerca de 350 espécies do gênero *Solanum* foram identificadas, muitas delas endêmicas, algumas são de grande importância econômica, outras fazem parte da alimentação humana, como por exemplo: batata, berinjela, tomate, jiló, pimentão e pimenta (Eich, 2008; Pereira *et al.*, 2016).

2.11 . Potencial biológico de plantas da família Solanaceae

As plantas são fontes promissoras de compostos bioativos que podem atuar contra fitopatógenos e por esse motivo diversas pesquisas com extratos brutos, óleos essenciais, metanólicos e outras frações dos vegetais estão sendo realizadas (Renault *et al.*, 2003;

Cantrell *et al.*, 2005; Satish *et al.*, 2007; Mdee *et al.*, 2009; Cogo *et al.*, 2011; Chen & Dai 2012).

A literatura tem demonstrado que plantas pertencentes a esta família são conhecidas por produzirem uma variedade de metabólitos secundários com as mais diversas classes químicas como os esteroides, alcaloides, heterosídeos, flavonóis, flavonas, tropanos, piridinas, alcaloides esteroidais, vitanolídeos, ecdisteróides, sesquiterpenos, diterpenos e até antraquinonas (Hegnauer, 1990; Harborne & Baxter, 1993; Griffin & Lin, 2000).

Representada no grupo vegetal das angiospermas, essa família é bem caracterizada, apesar da diversidade existente, é boprodutora de sesquiterpenos e uma grande variedade de alcaloides, como: tropânicos, quinolizidínicos, isoquinolínicos, indólicos, piridínicos, quinolínicos, esteroidais, pirrolizidínicos, pepiridínicos, isoquinolínicos e alcaloides mistos (Dixon, 2001; Pereira *et al.*, 2016).

Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando distintas partes das plantas desta família, principalmente frutos, folhas e flores no controle de parasitoses. Substâncias químicas com efeito nematotóxico têm sido isoladas de algumas plantas, pois os extratos botânicos apresentam algumas vantagens sobre os pesticidas sintéticos. Estes podem estar relacionados com o fornecimento de novos compostos que as pragas ainda não podem inativar; por serem menos concentrados e tóxicos que os compostos puros; exibirem biogradeação rápida; múltiplos modos de ação; grande espectro de ação seletiva dentro de cada classe de praga e por fim serem derivados de recursos renováveis comparados a materiais sintéticos (Lopes *et al.*, 2008).

Silva e seus colaboradores (2008) estudaram extratos alcaloídicos de frutos verdes de *Solanum asperum* Rich. no controle de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, molusco hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, parasita que causa esquistossomose em humanos, principalmente em crianças, com elevados níveis de

morbidade e mortalidade. Esse estudo químico biomonitorado levou ao isolamento de um alcaloide esteroidal, denominado solanandaina, juntamente com a solasonina e solamargina, ambos com ação moluscida.

Várias espécies de *Solanum* destacam-se pela capacidade de biossintetizar esteroides e alcaloides livres ou na forma de heterosídeos. Esses compostos, em geral, são de interesse terapêutico, apresentam um grande leque de atividades farmacológicas, além de atividade citotóxica, anticancerígena, anti-inflamatória, antiulcerogênica e moluscida. Além disso, são também responsáveis pela resistência natural das espécies em seu ecossistema (Gonçalves, 2016).

Prakash & Rhao (1948), avaliaram a ação nematocida presente em extratos aquosos de sementes e folhas de *Datura stramonium* sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Os extratos aquosos e metanólicos de folhas, bulbos e caules apresentam ação nematocida sobre juvenis de segundo estágio de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913 e *Anguina tritici* (Steinbuch, 1799) Filipjev, 1936, além do óleo extraído de sementes. Isolaram também alcaloides como a atropina, nicotina, escopalamina, ambos dos extratos de folhas, caules e bulbos, todos exibiram toxicidade para *T. semipenetrans* e *A. tritici*. Mani & Chitra (1989), também, avaliaram o efeito *in vitro* de extratos foliares de *Datura stramonium* L., onde obteve efeito tóxico sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.

Corrêa (2015) fez um estudo químico utilizando extratos de plantas da família Solanaceae com atividade fungitóxica a fungos fitopatogênicos, avaliando extratos foliares de 15 espécies de plantas dessa família. Dentre as plantas avaliadas, três se destacaram no controle de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, (2005), sendo elas *Solanum americanum* Mill., *Acnistus arborencens* L. e *Physalis peruviana* L., sendo encontrado em *S. americanum* compostos bioativos pertencentes à classe dos glicoalcaloides

inibindo o crescimento micelial de *M. pernicioso*, já no estudo de *A. arborencens* foi identificado um composto atico pertencente à classe dos vitanolidos, sendo sua ação antifúngica relatada pela primeira vez.

Nandakumar *et al.*, (2017) estudaram a atividade nematicida e a presença de fitocompostos em folhas de plantas pertencentes a família Solanaceae. Os resultados obtidos permitiram concluir que a atividade nematicida das espécies *Datura metel* L., *Datura innoxia* Mill., e *Brugmansia suaveolens* (Humboldt & Bonpland ex Willdenow) Bercht. & J.Presl, ocorreu devido a presença de fitocompostos como alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos, taninos, saponinas e triterpenos. Mani & Chitra (1989) avaliou o efeito *in vitro* de extratos foliares de *Datura stramonium* L., onde obteve efeito tóxico sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.

Qamar e colaboradores (1995) avaliaram extratos foliares incorporando resíduos vegetais ao solo de *Datura metel* e *Datura stramonium*, observaram forte ação antagonista a *Hoplolaimus*, *Helicotylenchus* e *Meloidogyne*. Do conteúdo total de alcaloides e de hioscina extraídos das folhas de *D. metel* contra *Hoplolaimus indicus* Sher 1963, *Helicotylenchus multicinctus* Cobb, 1893 e *M. incognita* mataram de 90 a 100% de todos os nematoides, enquanto que a hioscina foi efetiva somente contra *H. indicus*, com 90% de mortalidade.

Coradin (2011) e colaboradores em um levantamento abordando a espécie *Solanum mauritianum* Scop. (conhecida vulgarmente como "fumo brabo"), citam as propriedades desta solanácea usada na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias e controle do ciclo menstrual. Ainda apontam para o alto índice de alcaloides esteroidais presentes nesta espécie, substâncias usadas na síntese de compostos esteroidais anticoncepcionais e corticosteroides. Em *S. mauritianum* foi detectada uma maior concentração de solasodina, uma substância análoga a diosgenina, droga correntemente usada pela indústria farmacêutica para síntese de hormônios, em particular para anticoncepcionais.

Gonçalves e seus colaboradores (2016) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Solanum subinerme* Jacq. contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884, onde avaliaram os extratos oriundos de frutos, folhas, talos e raízes. Os extratos foram avaliados pelo método de difusão em disco. As análises dos extratos indicaram a presença de alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos. Os extratos dos frutos, folhas, caule e raízes de *S. subinerme* apresentaram efeitos satisfatórios para a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923), apresentando halos de inibição que variaram de 7 mm a 17,7 mm.

Pinheiro e colaboradores (2014) avaliaram vinte e sete acessos de *Solanum scuticum* M. Nee e um híbrido interespecífico de *Solanum scuticum* x *Solanum torvum* para resistência a *Meloidogyne enterolobii* Yang & Einsenbak, 1983. Dos vinte e sete acessos, quatorze foram resistentes quanto ao ataque de *M. enterolobii* e, em decorrência disso, foi sugerida a utilização dos referidos acessos como porta-enxertos. Nesse mesmo ano, os mesmos autores avaliaram a reação de dezessete acessos de *Solanum stramonifolium* Jacq. e um híbrido interespecífico de *S. torvum* x *S. scuticum* a *M. enterolobii*. Verificou-se que sete dos acessos avaliados e o híbrido foram resistentes ao ataque do nematoide.

Dentre os metabólitos secundários, com efeito, nematotóxico, ou seja, nematicida e/ou nematostático, 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., ácido trans aconítico em sementes de *Canavalia ensiformis* (Rocha *et al.*, 2017) Lectinas presentes em sementes de *C. ensiformis* atuam também sobre a inibição de fitonematoides, em doses de 500 μ g/ml são capazes de inibir o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, importante na cultura do pinheiro (Gaofu *et al.*, 2008) dentre outros compostos isolados de diferentes famílias vegetais como glicosídeos cianogênicos,

alcaloides (Papaveraceae), saponinas triterpênicas (Mimosaceae), compostos fenólicos (Asteraceae), sendo que há vários relatos da ação de compostos com ação nematicida (Prakash & Rhao, 1948; Vieira *et al.*, 2001; Chitwood, 2002; Thoden *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Multiplicação de *Meloidogyne incognita* em plantas de tabaco

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthii) foram semeadas e, aproximadamente 17 dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos medindo 20 x 30 x 12 cm, contendo cerca de 3180 cm³ da mistura estéril de terra, substrato comercial Bioplant® e areia na proporção de 4:2:4 respectivamente.

Após uma semana do transplante para os sacos plásticos, fez-se a inoculação com 2000 juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por um período de pelo menos 60 dias, em temperatura variando de 26 °C (noite) à 33 °C (dia). O controle químico fitossanitário foi feito contra mosca-branca, fungos, ácaros, colchonilhas, pulgões, tripses e broca do tomateiro, de maneira intercalada com os seguintes produtos: Triflumuron, Methomyl, Triofanato-metílico, Abamectina, Óleo mineral, Tiametoxan, todos de acordo com a dose recomendada de cada produto.

3.2. Extração de ovos e obtenção de J₂ de *M. incognita* a partir de raízes de tabaco

A extração dos ovos de *M. incognita* ocorreu por volta de dois meses após a inoculação das plantas de tabaco, sendo as raízes separadas da parte aérea, lavadas em água corrente, seccionadas em pedaços de 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador na menor velocidade por

30 segundos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) na concentração de 1,0% de cloro ativo para a obtenção dos ovos, de acordo com a técnica desenvolvida por Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981).

Em seguida, o material triturado, contendo os ovos foi transferido para peneiras com diferentes tamanhos: 35, 45, 200 e 500 mesh, de acordo com metodologia de Coolen & D'Herde (1972). O material retido na peneira de 500 mesh (ovos) foi lavado com água corrente até a total retirada do hipoclorito e a suspensão de ovos foi recolhida com auxílio de uma pisseta com água destilada (dH₂O). Em seguida procedeu-se duas centrifugações, sendo a primeira por 5 minutos na velocidade de 3500 rpm, descartando-se o sobrenadante e a segunda centrifugação por um minuto na mesma velocidade com solução de sacarose (454 g de açúcar cristal por litro de solução). Após a centrifugação, o sobrenadante contendo os ovos foi transferido para uma peneira com poros de 500 mesh e lavados em água corrente até a retirada da solução de sacarose.

Posteriormente, metade do material, contendo os ovos retidos na peneira de 500 mesh, foi transferido para uma câmara de eclosão. Após 24 horas, os juvenis eclodidos foram descartados sendo utilizados apenas os que eclodiram nas 24 horas subsequentes. Após esse período, uma alíquota contendo 1 ml foi transferida para câmara de contagem de Peter e, com o auxílio de um microscópio ótico, os juvenis presentes foram contabilizados e transferidos para microtubos na quantidade de 60 nematoides \pm 5 aproximadamente por tubo para a execução dos bioensaios *in vitro*. A outra metade do material foi transferida para tubo de 15 ml e, subsequentemente, os ovos foram contabilizados utilizando lâmina de Peter e microscópio ótico, sendo utilizados posteriormente em teste de eclosão de juvenis.

3.3. Obtenção e manutenção de solanáceas silvestres em casa de vegetação

Sementes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae, cedidas pelo banco de Germoplasma da Embrapa Hortaliças foram semeadas em bandejas contendo substrato Bioplant®, mantidas em casa de vegetação durante aproximadamente 50 dias, em temperatura variando entre 26-33 °C. Após esse período, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos de 20 x 30 cm x 12 cm, contendo cerca de 3180 cm³ da mistura estéril de solo, substrato comercial Bioplant® e areia na proporção de 4:2:4 respectivamente, sendo regadas duas vezes ao dia, adubadas conforme necessidade no decorrer do tempo de permanência em casa de vegetação.

3.4. Obtenção dos extratos crus aquosos (ECAs) das raízes de solanáceas

Cento e vinte dias após o transplântio das mudas de solanáceas, as espécies que apresentaram maior desenvolvimento da parte aérea foram retiradas dos sacos plásticos, sendo as raízes separadas da parte aérea e lavadas em água corrente até a retirada total de qualquer resíduo de solo e/ou substrato presente. Em seguida as raízes foram mantidas sobre papel toalha até a retirada da água presente (Figura 1).



Figura 1. Raízes das cinco espécies de solanáceas selvagens utilizadas para a obtenção dos ECAs. (A) espécie 1; (B) espécie 2; (C) espécie 3; (D) espécie 4; (E) espécie 5 (Fotos: Adriana A. Ferreira).

Posteriormente, as mesmas foram seccionadas com tesoura e maceradas com nitrogênio líquido em cadinho, com auxílio de pistilo (Figura 2).



Figura 2. Procedimento de maceração de raízes em cadinho, após o resfriamento em nitrogênio líquido para a obtenção dos ECAs (Foto: Adriana A. Ferreira).

Após a maceração, o material triturado foi pesado, transferido para um bequer e homogeneizado com água destilada mantendo uma proporção de 1g de raiz triturada para cada 6 ml de água destilada (dH₂O), mantido sob leve agitação durante 24 horas em câmara fria a 4 °C. Após esse período, os materiais foram filtrados em gaze e também em papel filtro tipo Mellita, metodologia adaptada de Ferris & Zheng (1999) e Rocha *et al.*, (2017). Os filtrados foram congelados utilizando nitrogênio líquido e liofilizados posteriormente.

3.5. Determinação da atividade nematotóxica dos ECAS utilizando juvenis de segundo estágio de *M. incognita*

Os bioensaios *in vitro* foram conduzidos para certificação da atividade nematotóxica dos ECAs oriundos das cinco espécies de plantas da família Solanaceae. Para isso, todos os bioensaios foram realizados em triplicata, e repetidos no tempo por três vezes cada.

Nos testes, alíquotas contendo os ECAs (1000µg.100µl⁻¹) foram transferidas individualmente para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, onde foram adicionados mais 400 µl de suspensão contendo aproximadamente 60 ± 5 juvenis de segundo estágio, resultando dessa forma em um volume final de 500 µl. Após 48 horas de exposição a 25 °C, os J₂ foram contabilizados com o auxílio de microscópio ótico e câmara de contagem de Peter, tendo

como controles positivo e negativo água destilada e etanol 70%, respectivamente (Haseeb & Butool, 1996; Dias *et al.*, 2000), com adaptações nos tempos de exposição, concentração e volume. As avaliações foram realizadas após 48 horas de exposição dos juvenis aos ECAs, determinando a atividade paralisante dos extratos. Após a avaliação de 48 horas, os juvenis que mantinham imóveis em cada microtubo, foram então lavados por três vezes, após, permaneceram em água durante 24 horas (ensaio de recuperação), sendo a certificação da ação nematicida dos ECAs obtida, após o ensaio de recuperação (Haseeb & Butool, 1996; Dias *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2017), com adaptações. Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.6. Certificação da ação nematicida dos ECAs - Ensaio de recuperação

Neste procedimento os J₂ paralisados submetidos, após 48 horas aos ECAs, foram centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante descartado, e os J₂ suspensos cuidadosamente em 1 ml de água destilada. A lavagem foi repetida três vezes e depois da última lavagem os J₂ permaneceram em água destilada por mais 24 horas. Subsequentemente, os J₂ foram contados e avaliados por microscopia óptica para a determinação da atividade nematicida dos ECAs (Haseeb & Butool, 1996; Dias *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2017), com adaptações. Os juvenis que permaneceram paralisados são tidos como mortos (ação nematicida) enquanto aqueles que recobram a motilidade são tidos como vivos (ação nematostática). Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.7. Avaliação da termoestabilidade dos ECAs

A avaliação da termoestabilidade dos ECAs por bioensaio *in vitro* de viabilidade é uma etapa importante para certificar se a ação nematotóxica dos ECAs permanece, após serem submetidos a temperaturas mais elevadas, passo relevante dentro das normas estabelecidas para produtos destinados a fins fitossanitários (Decreto Nº 6.913, de 23 de julho de 2009, Artigo 10, parágrafo 2º, e Lei Nº 7.802, de 11 julho de 1989). Trabalhos desenvolvidos no âmbito do LPCB que visam a obtenção de pré-tecnologias para o controle sustentável de fitonematoides utilizam este tipo de bioensaio (Rocha *et al.*, 2017). O teste de termoestabilidade foi realizado como forma de verificar a estabilidade térmica dos compostos presentes nos ECAs. Ainda neste contexto, foi levado em consideração a profundidade do sistema radicular de distintas espécies de plantas. Assim a temperatura de 50 °C foi utilizada nos bioensaios *in vitro* para certificar a estabilidade térmica dos vários materiais biológicos testados no controle de fitonematoide *M. incognita*.

Portanto, para a realização dos testes, alíquotas contendo cinco miligramas (5 mg) de cada um dos ECAs foram transferidos individualmente para microtubos de 2 ml contendo 1 ml de dH₂O. Após este procedimento, o material foi homogeneizado três vezes no período de 1 minuto cada com o auxílio de um agitador vórtex.

Em seguida, as amostras foram incubadas em banho maria durante 24 horas a 50 °C de temperatura, todos os microtubos devidamente fechados. Alíquotas de 1 mg de cada um dos ECAs obtidos no processo térmico foram submetidas a bioensaio *in vitro* de viabilidade/recuperação utilizando J₂ de *M. incognita* para verificar se as propriedades nematotóxicas seriam mantidas por essas amostras mesmo após aquecimento. O bioensaio foi realizado em triplicata, contendo em média 60 J₂ ± 5 por microtubo e os controles negativo (água) e positivo (etanol 70%). O ensaio de recuperação foi conduzido conforme descrição no item 3.6 para verificação do efeito nematicida e/ou nematostático dos ECAs tratados

termicamente. Os dados gerados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.8. Avaliação da atividade dos ECAs sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita*

Os ECAs foram avaliados quanto a sua capacidade de impedir a eclosão de juvenis de *M. incognita*. No entanto, dos cinco extratos avaliados sobre os juvenis, três deles foram testados também na inibição da eclosão de J₂ (ECAs das espécies 1, 4 e 5) e a dose letal média de ambos (DL₅₀) foi também mensurada.

Para esse estudo, foi selecionado os ECAs das espécies 1, 4 e 5 (devido a quantidade de material biológico suficiente para esse estudo e para os estudos posteriores). Em média, cerca de 100 ovos \pm 5, foram transferidos para microtubos de 2 ml, onde permaneceram durante 15 dias sob a ação dos extratos (tempo em que os ovos presentes no controle negativo haviam eclodidos). Em cada microtubo, foi adicionada uma quantidade de 3 mg dos ECAs selecionados tendo como volume final 1ml. O experimento foi realizado em triplicata, todos repetidos no tempo por três vezes cada, tendo como controle negativo, suspensão de ovos em dH₂O, controle positivo hipoclorito a 0,06% de cloro ativo. Os microtubos contendo os ovos foram mantidos a 28 °C e leituras dos ovos foram realizadas nos períodos de 24 h, 48 h e 96 h, 10 e 15 dias foram efetuadas, após exposição aos extratos (Haseeb & Butool, 1996; Adegbite, 2011) com adaptações. Os dados foram submetidos à análise estatística sendo avaliados pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.9. Avaliação de curva de concentração e dose letal média (DL₅₀)

Com base nos resultados obtidos na avaliação da bioatividade paralisante dos nematoides, atividade termoestável e atividade sobre a eclosão dos juvenis, os ECAs das espécies 1, 4 e 5 foram selecionados visando estimar a DL₅₀ (dose letal necessária para matar 50% dos nematoides presentes em cada amostra) após 48 horas de exposição. Para tanto, bioensaio contendo concentrações de (100, 250, 500 e 1000 mg.ml⁻¹) para cada um dos ECAs das espécies 1, 4 e 5 foi realizado. Em média, 60 J₂ de *M. incognita* ± 5, foram transferidos individualmente para micotubos contendo um volume final de 500 µl cada. Esses micotubos foram mantidos a temperatura ambiente, e, após 48 horas os J₂ paralisados foram contados com o auxílio de microscópio óptico e lâmina de Peter. O bioensaio foi conduzido em triplicata, todos repetidos no tempo por três vezes cada, tendo água destilada como controle negativo e etanol 70% como controle positivo e a suspensão de nematoides. A mortalidade dos J₂ foi certificada utilizando o ensaio de recuperação descrito no item 3.6 (Rocha *et al.*, 2017). Os dados gerados foram avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.10. Fracionamento e pré-concentração dos extratos aquosos em fase sólida (SPE-C18)

O fracionamento e pré-concentração dos extratos aquosos das espécies 1, 4 e 5 exibindo atividade nematicida, atividade termoestável e atividade sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita*, foram realizados a partir da extração em fase sólida (SPE), uma prévia à etapa de separação dos metabólitos em HPLC, sendo necessária como um método de pré-concentração e fracionamento dos ECAs de acordo com o tempo de retenção dos compostos presentes em cada extrato de cada espécie das plantas, sendo esses compostos separados por hidrofobicidade. Essa técnica cumpre os requisitos da química verde por redução ou total eliminação do consumo de solventes durante o procedimento analítico. Essa versatilidade

permite que a SPE seja aplicada para muitas finalidades, ou seja, purificação, isolamento, pré-concentração e fracionamento de classes químicas (Szewczyk *et al.*, 2015).

Esse método permite a separação dos extratos em quatro tempos diferentes, usando coluna (C-18), os quais são designados de eluatos. O primeiro eluato, designado de eluato (1) foi obtido a partir da filtração a vácuo dos ECAs usando água ultrapura acrescida de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% (sendo 999 ml de H₂O ultrapura + 1ml de TFA). O segundo produto, designado eluato (2) foi obtido a partir da filtração a vácuo dos ECAs contendo água ultra pura 75%, TFA 0,1%, acetonitrila a 25% sendo (749 ml água + 250 ml acetonitrila + 1 ml TFA). O terceiro produto, designado eluato (3) foi obtido a partir da filtração a vácuo dos ECAs contendo água ultrapura 50%, TFA 0,1%, acetonitrila 50%, sendo (499 ml água + 500 ml acetonitrila + 1 ml TFA). O eluato (4) foi obtido a partir da filtração a vácuo dos ECAs contendo acetonitrila 100% acrescido de TFA a 0,1%, sendo (999 ml de acetonitrila + 1 ml TFA).

Após as filtrações, os materiais obtidos foram rotaevaporados até a total liberação dos solventes presentes, resultando em um material com aspecto viscoso. Esses materiais foram transferidos para tubos tipo falcon, secados em aparelho speed vack durante 24 horas. O material desidratado obtido foi então guardado sob abrigo da luz e calor em tubos plásticos. Metodologia adaptada de (Rocha *et al.*, 2017), onde o autor utilizou membrana de 3.5kDa para separação de moléculas maiores e menores que 3.5kDa.

3.11. Avaliação da ação nematotóxica dos eluatos após extração em fase sólida (SPE-C18) sobre J₂ de *M. incognita*

A avaliação da ação nematotóxica dos eluatos obtidos após serem liofilizados foi conduzida segundo metodologia supramencionada nos itens 3.5 e 3.6. Os bioensaios foram

realizados mediante a solubilização de 200 mg de cada eluato em água Milli-Q acrescida de Dimetil Sulfóxido (DMSO) 1%. De cada eluato foi retirado quantidade referente a 500 µg para a realização dos bioensaios (quantidade definida por se tratar de um fracionamento, onde há compostos mais puros e mais concentrados quando comparados com os extratos crus aquosos, onde há presença de todas as classes de moléculas, incluindo açúcares e proteínas de cadeias mais longas e mais pesadas, biologicamente). O bioensaio foi conduzido em triplicata, tendo como controles negativo e positivo água destilada e etanol a 70% respectivamente. Ainda foi utilizado como controle interno uma solução de DMSO 1%. A certificação da atividade nematotóxica foi realizada seguindo os passos descritos nos itens 3.5 e 3.6., de acordo com metodologias de (Haseeb & Butool, 1996; Dias *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2017), com adaptações. Os dados foram submetidos à análise estatística sendo os dados avaliados pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.12. Purificação por Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-HPLC) do eluato nematotóxico da espécie 5

Os componentes presentes no eluato que apresentou atividade nematotóxica sobre os juvenis de segundo estágio foi então purificado utilizando cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), sendo selecionado para essa etapa do estudo, o eluato 1 da espécie 5. Os demais eluatos serão avaliados em estudos posteriores devido ao tempo disponível.

A amostra foi então solubilizada em tampão (TFA 0,1% e água ultra pura) e em seguida filtrada utilizando filtro de 0,22 µm (Millipore) e submetida à análise cromatográfica em coluna semipreparativa modelo (Jupiter 4µ Proteo, C18, 90A, 250 x 10 mm - Phenomenex) acoplada a um cromatógrafo (Shimadzu, Kyoto, Japão) e equilibrada com solvente A (H²O/TFA 0,1%). As amostras foram eluídas sob fluxo de 500µl por minuto

mediante aplicação de um gradiente de solvente B (acetonitrila/TFA 0,1%) seguindo o gradiente linear segmentado: 5% (0 a 10 min); 5 a 65% (10 a 65 min); 65 a 95% (65 a 70 min) e 95% (70 a 80 min) de solvente B. A eluição dos compostos foi monitorada nos comprimentos de ondas de 216 e 280 nm e as frações foram coletadas manualmente, totalizando 56 frações. Após as 56 frações obtidas do eluato 1 da espécie 5, as mesmas foram agrupadas em 7 grupos como forma de obter material suficiente a ser testado sobre os juvenis de *M. incognita*. O bioensaio usando os J₂ foi realizado conforme metodologia descrita nos itens 3.5 e 3.6 (Haseeb & Butool, 1996; Dias *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2017). Os dados foram submetidos à análise estatística sendo os dados avaliados pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.13. Validação da infectividade dos juvenis de *M. incognita* em mudas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthii após 48 horas de exposição aos ECAs das espécies 4 e 5

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthii) foram semeadas em sementeiras contendo solo estéril complementado com substrato Bioplant® na proporção de 1:1 onde foram mantidas por aproximadamente 20 dias para germinação em casa de vegetação. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para potes plásticos com capacidade de 300 ml cada, contendo solo preparado e esterilizado a base de substrato Bioplant® e areia lavada, na proporção de 4:2:4 respectivamente.

Após cinco dias do transplante das mudas, as mesmas foram separadas em cinco grupos experimentais: controle interno do experimento (plantas livres de nematoides), controle positivo (plantas tratadas com Aldicarb (280 mg.kg/solo, dose indicada pelo Agrofit), controle negativo (plantas infectadas com J₂) e os tratamentos (plantas infectadas com (J₂))

após 48 horas de exposição aos ECAs nematotóxicos das espécies 4 e 5). O experimento foi realizado em triplicata, delineamento em blocos casualizados.

Para esse estudo, foram selecionados os ECAs das espécies 4 e 5 devido a grande quantidade de material obtida (ECAs) e devido também aos resultados positivos obtidos até o momento para essas duas espécies de plantas avaliadas.

As suspensões dos ECAs das espécies 4 e 5 foram preparadas com concentrações de 1, 2, 3 ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), onde $3000 \text{ juvenis} \pm 5$ permaneceram por um período de 48 horas em cada concentração. Após foram lavados por 3 vezes em água. De cada tratamento, $1000 \text{ juvenis de } M. \text{ incognita} \pm 5$, foram inoculados separadamente em mudas de tabaco (sendo cada tratamento realizado em triplicata), aplicados em orifícios de 1-2 cm feitos no solo ao redor de cada planta, não permitindo que o excesso da solução extravazasse pela parte inferior do pote plástico, permanecendo por um período de 30 dias em casa de vegetação ($26\text{-}33 \text{ }^\circ\text{C}$). Este teste foi realizado para verificar se os J_2 inativos ainda permaneciam infectivos após serem submetidos às condições ambientais naturais. O número de massa de ovos e de galhas, assim como o fator de reprodução foram avaliados, permitindo certificar se os J_2 após os tratamentos foram capazes de penetrar a raiz, estabelecer o sítio de alimentação e, em última instância, completar o ciclo de vida.

3.13.1. Determinação do fator de reprodução, número de galhas e massa de ovos

Decorridos 30 dias da inoculação dos juvenis de segundo estágio, mediu-se o comprimento da haste dos tabacos para verificação de possível interferência no desenvolvimento das plantas. As raízes das plantas de tabaco pertencentes aos tratamentos avaliados (controle positivo, controle negativo e dos tratamentos) foram, então, removidas e levadas para laboratório, onde foram cuidadosamente lavadas em água corrente e coradas com

β -phloxin (Sigma-Aldrich, 0,015 mg/l) por 5 minutos. Após esse procedimento, com auxílio de um microscópio estereoscópio, determinou-se o número de massas de ovos e o número de galhas e, após extração de nematoides pelas metodologias propostas por Jenkins (1964) para determinação de J₂ presentes no solo e de Coolen & D' Herde (1972) no caso de ovos/J₂ presentes nas raízes, determinou-se o fator de reprodução após contagem em microscópio óptico.

3.14. Avaliação de fitotoxicidade em semente de soja

A realização da avaliação fitotóxica é indicada em casos de trabalhos realizados com extratos e com produtos de origem vegetal ou sintética, visando à avaliação de tais produtos com o intuito de verificar possíveis níveis de toxicidez. Trabalhos desenvolvidos com extratos oriundos de vegetais para fins fitossanitários devem ser avaliados também quanto à atividade fitotóxica, como sendo parte das exigências estabelecidas no parágrafo segundo do Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, Decreto 6.323, de 27 de dezembro de 2007, Decreto N° 6.913, de 23 de julho de 2009, Instrução Normativa Conjunta SDA/SDC/ANVISA/IBAMA no 1, de 24 de maio de 2011 e Especificações de Referência publicadas.

Para a realização da avaliação fitotóxica, sementes de soja (*Glycine max*, BRS 7980) foram submetidas a 1 mg.ml⁻¹ dos ECAs das espécies 1, 4 e 5 (os ECAs foram selecionados devido a quantidade suficiente de material de cada um, os demais ECAs serão testados em estudos posteriores). As sementes foram desinfestadas em soluções de etanol 70%, cloro ativo 1% e água destilada por dois minutos cada. Posteriormente as sementes foram transferidas separadamente para tubos de ensaio contendo 20 ml de meio MS (Murashigie & Skoog, 1962) individualmente em cada tubo.

Após o resfriamento do meio, 1 mg de ECA foi adicionado em cada tubo que permaneceu por 12 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 $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ com fotoperíodo de 16 horas. 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.

3.15. Avaliação de toxicidade sobre hemácias

A avaliação de toxicidade é realizada com base nas exigências estabelecidas de produtos com fins fitossanitários estabelecidas no parágrafo segundo do Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, Decreto 6.323, de 27 de dezembro de 2007, Decreto N° 6.913, de 23 de julho de 2009, Instrução Normativa Conjunta SDA/SDC/ANVISA/IBAMA no 1, de 24 de maio de 2011 e Especificações de Referência publicadas.

O ensaio de toxicidade foi realizado utilizando amostra de sangue suíno adquirido por coleta venosa heparinizada de animal mantido na Fazenda Sucupira da Embrapa. O sangue total obtido foi lavado em solução fisiológica (NaCl) por três vezes, centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos visando a retirada total das proteínas e plaquetas, após foi realizado uma diluição, tendo como concentração final 8% do concentrado de hemácias. Para avaliar o efeito hemolítico dos ECAs, alíquotas contendo 5 mg de cada ECA foram separados e solubilizados em 1 ml de solução fisiológica salina 0,9% (NaCl). Após esse procedimento, as amostras foram agitadas vagarosamente por dois minutos em agitador e em seguida filtradas em filtro 0,22 μm e mantidas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Para o ensaio de hemólise foram adicionadas individualmente em

cada poço da placa de Elisa a diluição do concentrado de hemácia (100 µl) e 1mg (100 µl) de cada um dos ECAs (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2004).

O ensaio foi realizado em triplicata, todos repetidos no tempo por duas vezes cada, tendo como controle positivo dH₂O, controle negativo a diluição do concentrado de hemácias adicionados de solução fisiológica (NaCL 0,9%) e os ECAs (100 µl), em um volume final de 300 µl. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com leve agitação a 310 rpm durante 30 minutos. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante de cada repetição inclusive das amostras do branco foi transferido para outra placa de 96 poços, para a realização de leitura espectrofotométrica a 540 nm utilizando-se um leitor de microplacas Benchmark PlusTM.

3.16. Avaliação de toxicidade sobre fibroblastos

A avaliação da toxicidade foi também avaliada sobre fibroblastos segundo metodologia Li *et al.*, 2016 e Ombrena, 2016. A linhagem de fibroblastos utilizada foi (NIH3T3) da American Type Culture Collection (ATCC) proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia 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 – Streptomina, Life, EUA) (v/v), e mantidas em estufa umidificada (Thermo Scientific, EUA) a 37 °C e 5% de CO₂ (Ombredane, 2016).

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 observar 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. Após 3 minutos de centrifugação a 2000 rpm a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado.

O pellet formado foi ressuspendido em 1 ml de meio de cultura e dez microlitros (μl) das células de fibroblastos (NIH3T3) 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: $n^\circ \text{ de células/ml} = n^\circ \text{ de células contadas} / n^\circ \text{ de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10000$. 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.

Após, os ECAs e o controle foram previamente preparados em microtubos de polipropileno de 2 ml cada. Os ECAs foram diluídos em meio de cultura completo (DEMEM) para obter as concentrações de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g/ml}$. A amostra do 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 eram adicionados 200 μl das diferentes amostras citadas acima (250, 500, 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g/ml}$). As placas foram incubadas na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 e 48 horas.

Após 24 e 48 horas de exposição dos fibroblastos às diferentes concentrações das amostras, o ensaio 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. A absorbância dos poços foi avaliada por espectrofotômetro (Molecular devices, EUA) a 595 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do controle negativo (água ultrapura) como 100% de viabilidade (Li *et al.*, 2016; Ombredane, 2016).

3.17. Bioensaio de especificidade utilizando organismos não-alvo

A análise de especificidade dos ECAs de raízes das cinco espécies de solanáceas exibindo atividade nematotóxica foram avaliados contra bactérias, fungos e levedura em experimentos conduzidos *in vitro*, onde foi avaliado a não interferência desses ECAs sobre esses organismos benéficos presentes na rizosfera. Os testes utilizando os organismos não alvo são realizados com base nas normas exigidas para desenvolvimento de produto fitossanitário com base orgânica, Decreto Nº 6.913, de 23 de julho de 2009, Artigo 10, parágrafo 2º, e Lei Nº 7.802, de 11 julho de 1989, que dispõe experimentos com base orgânica envolvendo patentes para fins fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica serão estabelecidas com base em informações, testes e estudos agronômicos, toxicológicos e ambientais realizados por instituições públicas ou privadas de ensino, assistência técnica e pesquisa, em procedimento coordenado pelo setor de agricultura orgânica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mediante a tais exigências, metodologias foram desenvolvidas no Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos (LPCB) e adaptadas de acordo com cada organismo não alvo utilizado para a realização dos bioensaios utilizando ECAs.

3.17.1. Bioensaio utilizando bactérias

Os ECAs das cinco espécies de plantas da família Solanaceae que exibiram atividade nematotóxica foram avaliados contra as espécies de bactérias noduladoras de raízes de plantas da família Fabaceae. *Bradyrhizobium diazoefficiaens* SEMIA 5080 Delamuta e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (Kirchner) Jordan, ambas isoladas de cultura de soja, e duas estirpes da espécie *Azospirillum brasiliense*, identificadas como AbV5 e AbV6. Os bioensaios foram conduzidos em triplicata, todos repetidos no tempo por três vezes cada, sendo utilizado meio Yeast Mannitol Agar w/Congo Red (YMA) para as espécies de *Bradyrhizobium* e meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose (DYGS) para as estirpes de *Azospirillum*. Os inóculos foram preparados a partir de cultura em meio líquido, onde permaneceram em crescimento em agitador a 30 °C, 150 rpm por 48 horas para as estirpes de *Azospirillum*. As espécies de *Bradyrhizobium* cresceram em média 5 a 6 dias nas mesmas condições. Após o crescimento em meio líquido de ambas, 200 µl foram retirados de cada suspensão bacteriana, e com auxílio de uma alça de Drigalski, a suspensão contendo as células bacterianas foi espalhada de forma uniforme por toda a dimensão da placa de Petri. A técnica de difusão em disco foi realizada utilizando o método padrão recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS) com modificações, onde os discos foram distribuídos na superfície do ágar e a quantidade contendo 1mg/ml⁻¹ de cada ECA foi dispensada no centro de cada disco. O controle negativo usado no teste foi dH₂O.

As placas foram mantidas em estufas com temperatura média de 30 °C. As espécies de *Azospirillum* e de *Bradyrhizobium* permaneceram em crescimento por um período de 5 dias. A avaliação foi feita mediante a presença ou ausência de halo ao redor dos disco de papel onde os extratos foram adicionados. Teste realizado com base nas normas exigidas dos órgãos reponsáveis em casos envolvendo patente/produtos/co-produtos para fins fitossanitários.

Mediante a tais exigências, metodologias foram desenvolvidas e adaptadas no próprio LPCB de acordo com cada organismo não alvo a ser avaliado utilizando ECAs (Rocha *et al.*, 2017).

3.17.2. Bioensaio utilizando fungos filamentosos

Os ECAs das cinco espécies de plantas da família Solanaceae foram também avaliados quanto ao crescimento micelial de duas espécies de *Trichoderma* spp., (Família Hipocreaceae) cedidos pelo laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As espécies foram identificadas molecularmente com a utilização das regiões ITS-I e ITS-II, sendo preservados sob a nomenclatura CEN 766 e CEN 759 (*Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg, Sydowia), ambos isolados de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.).

O experimento foi conduzido em triplicata, onde 15 mg de cada ECA foram adicionados individualmente em placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo 25ml de meio batata-dextrose-ágar (BDA) em cada placa. O experimento foi realizado em uma concentração quinze vezes maior à concentração nematicida (1mg/ml^{-1}), fato ocorrido devido a diferença existente entre as espécies de fungos e de nematoides. Fungos anamórficos apresentam como forma de resistência os conídios, já os nematoides do gênero *Meloidogyne* permanecem por períodos mais curtos nos solos e não apresentam formas de resistência como forma os fungos, devido a esse fator, o experimento foi conduzido utilizando 15 mg de cada ECA por placa.

Os ECAs foram solubilizados junto ao meio, com o auxílio de alça de Drigalski através de 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante três dias. A análise do crescimento micelial foi feita de maneira qualitativa para aqueles. Os dados

foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991): $IVCM = \Sigma (D - D_a)/N$, sendo: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação.

ECAs que não demonstraram nenhum efeito sobre o crescimento dos micélios. Já para o ECA que apresentou inibição do crescimento micelial para as duas espécies de *Trichoderma* avaliadas, a taxa de inibição foi mensurada de maneira quantitativa, utilizando paquímetro digital. Esse teste utilizando o organismo não alvo *Trichoderma* sp. está regulamentado dentro do Decreto N° 6.913, de 23 de julho de 2009, Artigo 10, parágrafo 2° e Lei N° 7.802, de 11 julho de 1989. Mediante a tais exigências, metodologias foram desenvolvidas e adaptadas no LPCB de acordo com cada organismo não alvo a ser avaliado utilizando ECAs (Rocha *et al.*, 2017).

Das placas que apresentarem inibição no crescimento micelial bem como os controles de cada espécie, os conídios presentes serão coletados através de raspagem utilizando lâmina de microscopia óptica, e, uma suspensão contendo os conídios será preparada. Dessas soluções, será retirado 10µl de cada, sendo transferidas para novas placas de Petri contendo meio BDA ágar, sendo realizados em triplicatas. As suspensões serão dispensadas sobre o meio em três lugares distintos, permanecendo por um período de 16 horas. Após, o meio contendo os conídios serão seccionados nas partes onde as soluções serão dispensadas, colocados sobre lâminas microscópicas e avaliados em microscópio óptico. Os conídios presentes serão contabilizados, bem como os conídios que apresentaram germinação com formação de tubos germinativos. De cada amostra, inclusive as do controle negativo, um total de 100 conídios ou conídios já germinados ou em processo de germinação serão contabilizados.

Para os ECAs que apresentarem inibição do crescimento micelial, os conídios que conseguirem germinar após 16 horas em meio BDA, esses ECAs serão constatados como sendo não tóxicos, pois, mesmo que de alguma forma o crescimento micelial tenha sido inibido, os ECAs não provocaram interferência no processo de germinação conidial, bem como a formação de tubos germinativos, os mesmos mantendo o vigor.

3.17.3. Bioensaio utilizando levedura

Adicionalmente os 5 ECAs foram testados contra 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 por duas vezes cada, utilizando meio Yeast Extract - Peptone - Dextrose (YPD). A técnica de difusão em disco foi realizada utilizando o método padrão recomendado pelo NCCLS com modificações, onde os discos foram distribuídos na superfície do ágar e a quantidade de 1 mg dos ECAs foi dispensado individualmente no centro de cada disco. O controle negativo usado no teste foi água destilada. As placas permaneceram por um período de 24 horas em estufa tipo B.O.D com fotoperíodo de 12 horas a 28 °C. Os dados foram avaliados mediante presença ou ausência da formação de halo. Teste realizado com base nas especificações e exigências contidas no Decreto Nº 6.913, de 23 de julho de 2009, Artigo 10, parágrafo 2º, e Lei Nº 7.802, de 11 julho de 1989, devido a tais exigências, metodologias foram desenvolvidas e adaptadas pelo Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos, LPCB, de acordo com cada organismo não alvo a ser avaliado utilizando ECAs (Rocha *et al.*, 2017).

3.18. Identificação da fração majoritária via LC-MS/UPLC-PDA (ECA espécie 1)

Uma alíquota de 100 µl do ECA da espécie 1 obtida a partir da solução estoque (1mg/ml^{-1}) foi submetida à cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), utilizando um equipamento UPLC/PDA, coluna Acquit UPLC® HSS T3 C18 $1,8\mu\text{m}$ $2,1\times 150$ mm, fase móvel - solvente A: H_2O ultra pura/TFA 0,1%; solvente B: Acetonitrila/TFA 0,1%. O método utilizado para as corridas no HPLC foi o método segmentado, variando de 5% a 95% de acetonitrila, realizadas em 70 minutos cada corrida. Após as corridas, verificou-se uma fração majoritária no tempo de retenção de 22 minutos, a mesma coletada individualmente para posterior identificação e realização de biotestes *in vitro* utilizando J_2 de *M. incognita*.

3.19. Determinação da atividade nematotóxica *in vitro* da fração cromatográfica identificada e de composto adquirido da SIGMA

Um miligramama (1 mg) da fração cromatográfica contendo como pico majoritário identificado via LC-MS/UPLC-PDA do ECA da espécie 1, foi transferido para microtubo e solubilizada em solução etanólica a 2%, em um volume de 1 ml. O composto revelado nas análises, foi também adquirido da SIGMA, e uma alíquota contendo 1 mg do mesmo foi retirada e transferida para microtubo, solubilizada nas mesmas condições citadas anteriormente.

O bioensaio foi realizado em triplicata, repetido por mais uma vez, nas mesmas condições, com concentração de ($50\mu\text{g}.500\mu\text{l}^{-1}$) do composto identificado e do composto adquirido da marca SIGMA e teve como controles negativo e positivo água destilada e etanol 70% respectivamente. Experimento realizado conforme descrição supramencionada nos itens

3.5 e 3.6., baseado nas metodologias de (Rocha *et al.*, 2017) com adaptações. Os dados foram submetidos à análise estatística sendo os dados avaliados pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey.

3.20. Liofilização dos ECAs, eluatos e frações cromatográficas

Os ECAs, os eluatos e as frações cromatográficas foram liofilizados em um Savant-Super Modulyo (Thermo-Fischer, Waltham, MA, EUA). Após esse procedimento, os materiais foram armazenados em frascos com tampa e mantidos a temperatura ambiente para posterior utilização em bioensaios *in vitro*.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação por bioensaio *in vitro* dos ECAs oriundos de raízes de plantas da família Solanaceae sobre J₂ de *M. incognita*

Os ECAs obtidos a partir de raízes de cinco espécies de plantas pertencentes à família Solanaceae foram submetidos a bioensaio de viabilidade *in vitro* contendo em média 60 ± 5 J₂ de *M. incognita*. O resultado do bioensaio demonstrou a paralisação de aproximadamente 100% dos J₂ para todos os ECAs quando avaliados na concentração de 1mg.ml^{-1} , após 48 horas de exposição (Figura 3).

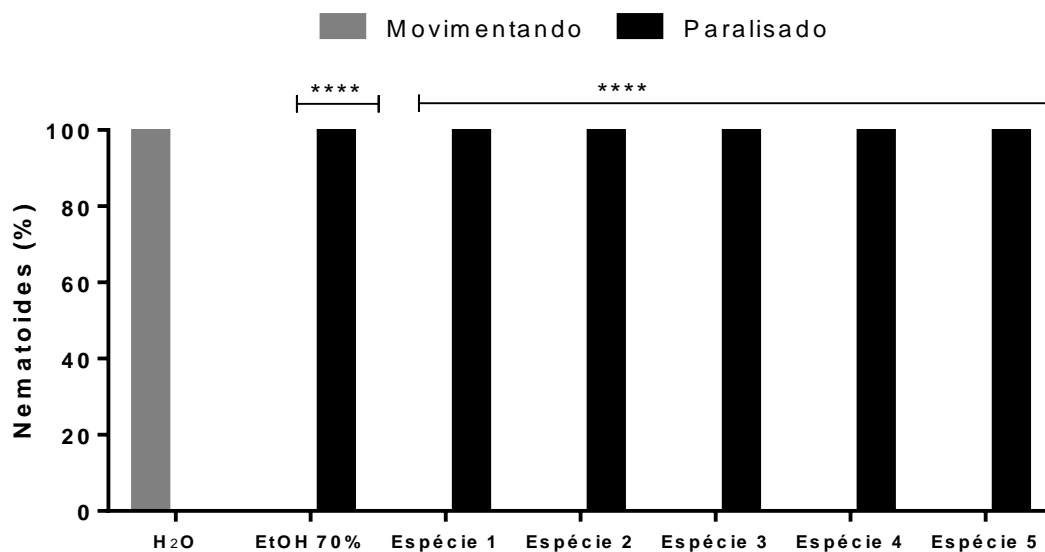


Figura 3. Bioensaio *in vitro* de viabilidade para selecionar o(s) extrato(s) cru(s) aquosos(s) de raiz de cinco espécies de plantas da família Solanaceae mais efetivo(s) sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição. Controle positivo etanol 70%, controle negativo, dH₂O. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos tratamentos das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 quando comparados com o controle negativo dH₂O. Barras com “****” não difere entre si, com: p<0,0001.

No ensaio de recuperação utilizado para certificar a atividade nematicida e/ou nematostática, o ECA da espécie 1 foi o mais efetivo, matando aproximadamente 100% dos J₂ presentes seguido pelos ECAs das espécies 5, com atividade nematicida acima de 95% e o ECA da espécie 3, com atividade nematicida de 85% sobre os juvenis, após 48 horas de exposição (Figura 6). Em relação aos ECAs das espécies 2 e 4, a ação nematicida sobre os J₂ de *M. incognita*, foi de 75% para o ECA da espécie 2 e 70% para o ECA da espécie 4 (Figura 4). Vale enfatizar que os J₂ expostos aos ECAs das espécies 1, 4 e 5 apresentaram o corpo completamente retesado com a presença de vacúolos ao longo da região intestinal.

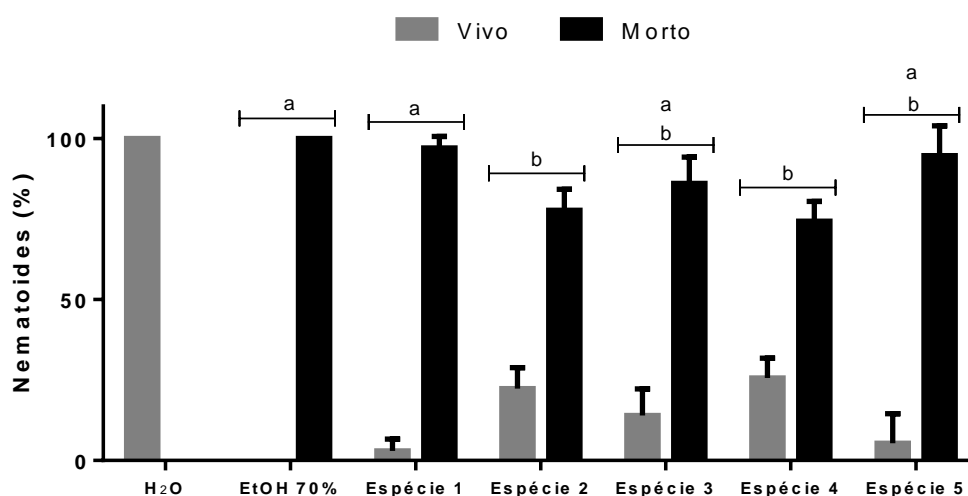


Figura 4. Ensaio de recuperação dos juvenis de *Meloidogyne incognita* demonstrando o efeito nematicida dos ECAs extraído de raízes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae. Controle positivo etanol 70% e controle negativo, dH₂O. Barras com letras iguais não diferiram entre si pelo teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH₂O: Barras contendo letras iguais não diferem entre si , com: $p < 0,0001$.

4.2. Avaliação da termoestabilidade dos ECAs

Para avaliar a estabilidade térmica dos ECAs (1mg/ml^{-1}) obtidos a partir das cinco espécies de plantas da família Solanaceae, foram preliminarmente aquecidos à temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas. Subsequentemente, após resfriadas, as amostras foram submetidas à bioensaio *in vitro* de viabilidade e ensaio de recuperação utilizando J₂ de *M. incognita*. Os resultados demonstraram que todos os ECAs foram capazes de paralisar aproximadamente 100% dos J₂, após 48 horas de exposição no bioensaio *in vitro* de viabilidade (Figura 5).

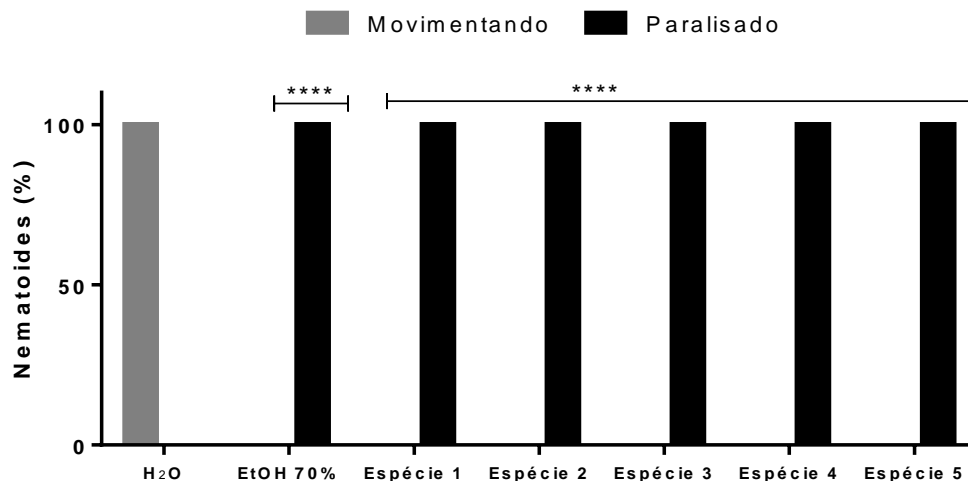


Figura 5. Bioensaio de termoestabilidade (50 °C) *in vitro* dos ECAs de raízes de cinco espécies de plantas da família Solanaceae, 1mg/ml⁻¹. Controle negativo e positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH₂O, barras com “****” não diferem entre si, com: p<0,0001.

O bioensaio de recuperação demonstrou que mais de 90% dos J₂ tratados com os ECAs das espécies 1, 2, 4 e 5 previamente aquecidos permaneceram paralisados, após 48 horas de exposição confirmando a atividade nematicida destas amostras (Figura 6). Inversamente, 90% dos J₂ tratados com o ECA da espécie 3 foram capazes de recobrar a motilidade, certificando a atividade nematostática deste ECA após o aquecimento do material (Figura 6).

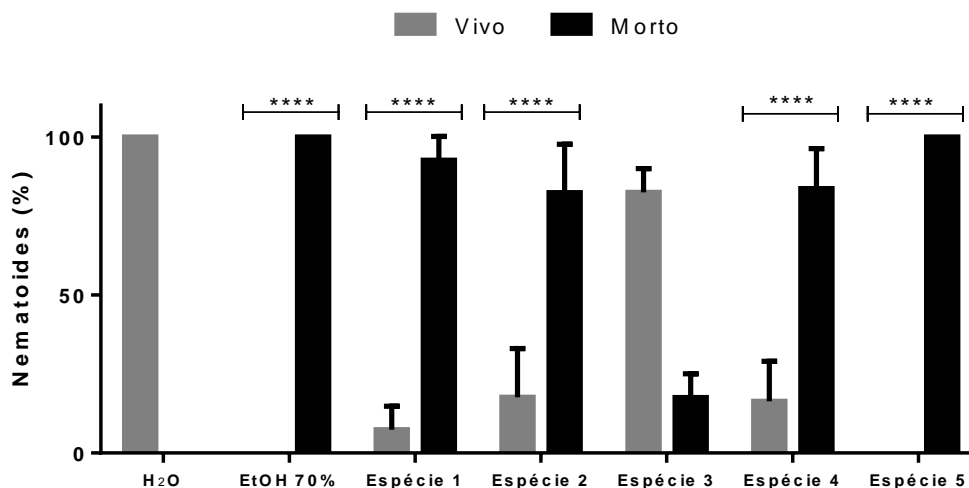


Figura 6. Ensaio de recuperação demonstrando o efeito nematotóxico dos ECAs submetidos à 50 °C após 24 horas em água. Controle negativo: água destilada, controle positivo: etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos tratamentos das espécies 1, 2, 4 e 5 quando comparados com o controle negativo dH₂O. Barras com “****” não diferem entre si com: p<0,0001.

4.3. Ação dos ECAs sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita*

Dos ECAs avaliados sobre a eclosão de juvenis todos apresentaram um percentual de 99% de inibição da eclosão, após 15 dias de submissão aos ECAs.

O bioensaio *in vitro* relativo à ação dos ECAs sobre a eclosão de juvenis (100 ovos) de *M. incognita* foi realizado ao longo de um período experimental de 15 dias. Os resultados demonstraram a completa ausência de J₂ eclodidos no primeiro dia de exposição, tanto para os controles negativo (água destilada) e positivo (NaClO a 0,06%) quanto para os tratamentos utilizando os ECAs (3mg/ml⁻¹) de raízes das espécies 1, 4 e 5 (Figura 7). No sétimo dia de exposição dos ovos (J₂ D7), verificou-se a eclosão de trinta (30) J₂ para o controle negativo (Figura 7). No entanto, não foi registrada a eclosão de J₂ para o controle positivo e apenas 2 J₂ para o ECA da espécie 4 e 2 juvenis para o ECA da espécie 5, após esse período (Figura

7). No décimo quinto dia (J₂ D15), notou-se a presença de aproximadamente 90 juvenis no controle negativo, confirmando a eclosão da maioria dos ovos presentes. De forma oposta, não foi registrada a presença de J₂ para o controle positivo e para os ECAs das espécies avaliadas. Vale enfatizar que os ovos tratados com hipoclorito de sódio não estavam presentes ao final do experimento, ou seja, foram destruídos ao longo do período experimental por ação do reagente supracitado.

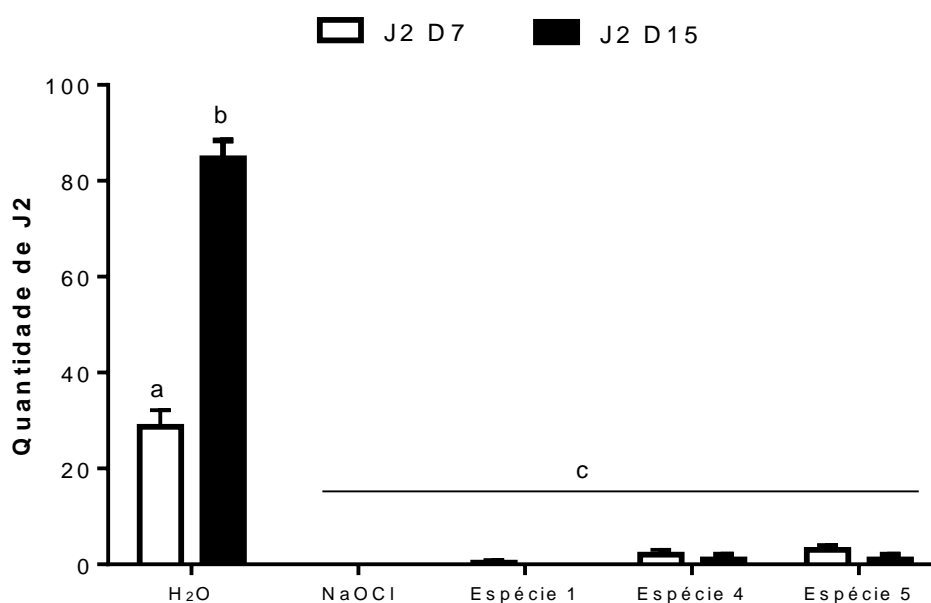


Figura 7. Bioensaio *in vitro* utilizando 100 ovos de *Meloidogyne incognita* submetidos a concentração de (3mg. ml⁻¹) dos ECAs de raízes de solanáceas das espécies: 1, 4 e 5. Controle negativo H₂O e a suspensão de ovos, controle positivo NaOCl 0,06% de cloro ativo. Teste ANOVA Two-way com pos teste Tukey. “a”, “b” e “c”: diferentes entre si com p<0,05.

Análise por microscopia óptica dos ovos tratados com os ECAs, após o décimo quinto dia, apresentaram a formação de grandes vacúolos indicando a ruptura de membranas e a inviabilização dos juvenis de primeiro estágio (J₁) (Figura 8, linha 2). Essas alterações não foram observadas para os ovos utilizados no controle negativo que continha apenas água destilada (Figura 8, linha 1).

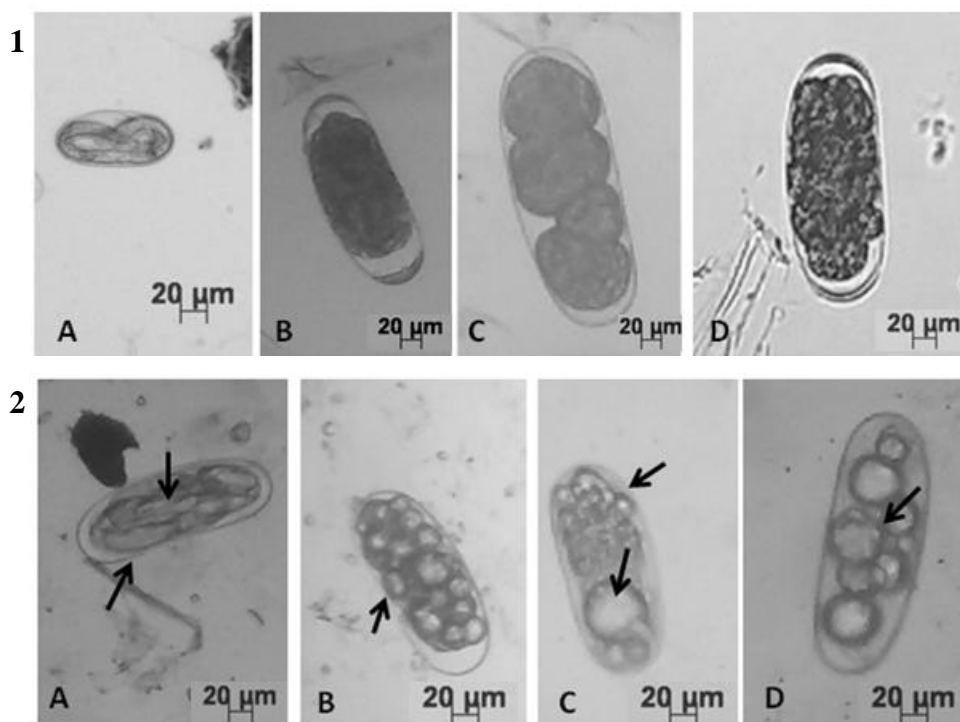


Figura 8. Linha (1): ovos viáveis de *Meloidogyne incognita* em várias fases do desenvolvimento embrionário, linha (2): ovos inviáveis de *M. incognita* em distintas fases do desenvolvimento embrionário idênticos aos ovos da linha (1). Linha (2), ovos apresentando rompimento de membrana linha (2A) e presença de vacúolos (2B, 2C, 2D) após 15 dias de exposição aos ECAs das espécies 1, 4 e 5 em uma concentração de $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Fotos: Adriana A. Ferreira).

4.4. Avaliação curva de concentração e DL_{50}

A avaliação da menor concentração efetiva sobre J_2 de *M. incognita* e a dose letal inibitória (DL_{50}) foi realizada por meio de uma curva de concentrações utilizando os ECAs das espécies (1, 4 e 5). Para tanto, foram realizados novos bioensaios com as seguintes concentrações (100 , 250 , 500 e $1000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) respectivamente. O bioensaio de viabilidade referente à curva de concentração do ECA da espécie 1, mostrou que para as concentrações de $100\ \mu\text{g}$ e $250\ \mu\text{g}$ acima de 90% dos J_2 permaneceram movimentando enquanto para as concentrações de 500 e $1000\ \mu\text{g}$, 100% dos J_2 estavam paralisados, após 48 horas de exposição

(Figura 9). No caso do bioensaio de viabilidade referente à curva de concentração do ECA da espécie 4, foi observado que, para a concentração de 100 μg , apenas ao redor de 40% dos J_2 estavam paralisados contra 100% para as concentrações de 250, 500 e 1000 μg , após 48 horas de exposição (Figura 9). Já o bioensaio de viabilidade relativo à curva de concentração do ECA da espécie 5, foi notado que acima de 95% dos J_2 presentes estavam completamente paralisados para todas as concentrações avaliadas, após 48 horas de exposição (Figura 9).

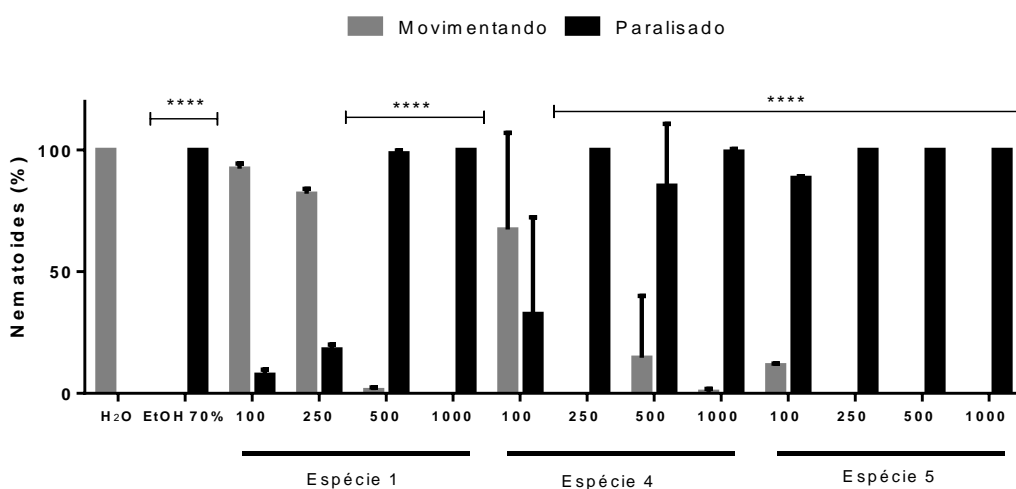


Figura 9. Bioensaio *in vitro*-curva de concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) do(s) extrato(s) cru(s) aquosos(s) de raízes das espécies 1, 4 e 5 de plantas da família Solanaceae sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após 48 horas de exposição para avaliar a concentração mínima de atividade dos ECAs sobre os juvenis. Controle negativo e positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH₂O. Barras com “****” não difere entre si, com: $p < 0,0001$.

No bioensaio de recuperação relacionado à curva de concentração do ECA da espécie 1, observou-se atividade nematostática para a concentração de 500 μg com 100% dos J_2 recuperando a mobilidade (Figura 10). Diametralmente oposto, foi observada atividade nematicida para a concentração de 1000 μg , com 100% dos J_2 completamente paralisados, após 48 horas de exposição (Figura 10). No bioensaio

de recuperação relativo à curva de concentração do ECA da espécie 4, ficou demonstrado que 100% dos juvenis submetidos as concentrações de 250 μg recobriram a movimentação, confirmando o efeito nematostático para essa amostra.

Em relação à concentração de 500 e 1000 μg , acima de 96% dos J_2 permaneceram estáticos, certificando a atividade nematicida (Figura 10). No bioensaio de recuperação relativo à curva de concentração do ECA da espécie 5, observou-se que acima de 85% dos J_2 recobriram a motilidade, para as concentrações de 100 e 250 μg confirmando a atividade nematostáticas destas amostras (Figura 10). No caso dos tratamentos com as concentrações de 500 e 1000 μg ao redor de 100% dos J_2 permaneceram estáticos, retificando o efeito nematicida para as distintas concentrações avaliadas do ECA da espécie 5 (Figura 10).

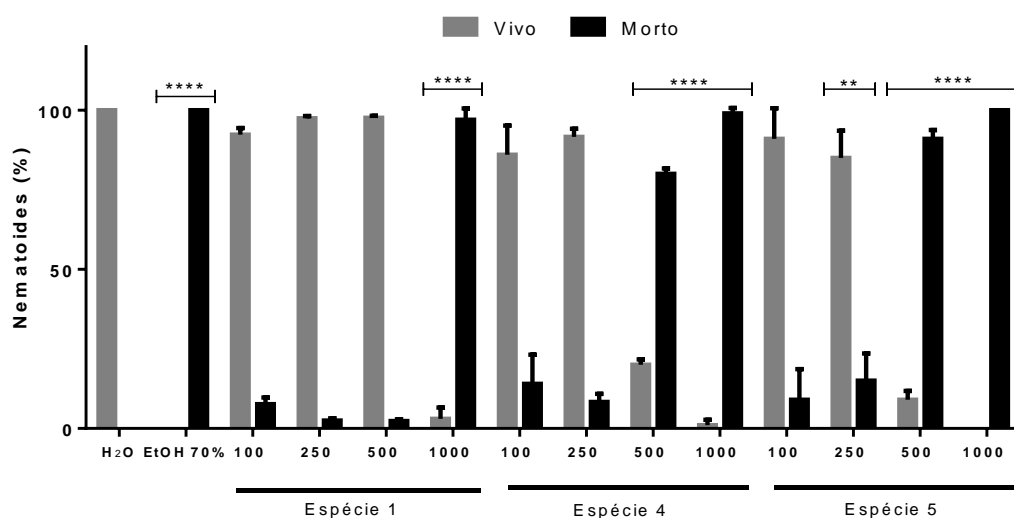


Figura 10. Ensaio de recuperação curva de concentração. Juvenis de *Meloidogyne incognita*, após 24 horas em água, certificando a correlação entre a concentração e o tipo de atividade nematotóxica para cada ECA de raiz de plantas da família Solanaceae. Controle positivo etanol 70% e controle negativo: dH₂O. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle negativo dH₂O. Barras com “****” não difere entre si, com: $p < 0,0001$; barra com “**” difere dos demais tratamentos, com: $p < 0,01$.

A dose letal média (DL₅₀) correspondendo ao tete de avaliação da toxicidade dos referidos ECAs está representada na Tabela 1. O ECA da espécie 1 apresentou uma DL₅₀ de 716 µg/l⁻¹, contra valor aproximado 400 µg/ml⁻¹ para o ECA da espécie 4, já o ECA da espécie 5 exibiu uma DL₅₀ de 336 µg/ml⁻¹.

Tabela 1. Médias da dose letal média (DL₅₀) capaz de matar 50% dos juvenis de *M. incognita* dos ECAs das espécies 01, 04 e 05.

Tratamentos	DL ₅₀
Espécie 01	716 µg/ml ⁻¹
Espécie 04	≈400 µg/ml ⁻¹
Espécie 05	336 µg/ml ⁻¹

4.5. Ação dos eluatos fracionados por SPE-C18 dos ECAs das espécies 1, 4, e 5 sobre J₂ *M. incognita*

Os eluatos (500µg/ml⁻¹) obtidos a partir dos ECAs das espécies 1, 4 e 5, fracionados por SPE-C18, foram submetidos a bioensaio de viabilidade *in vitro* utilizando 60 ± 5 J₂ de *M. incognita*. O resultado do bioensaio demonstrou a paralisação de 100% dos J₂ para todos os eluatos avaliados, após 48 horas de exposição (Figura 11).

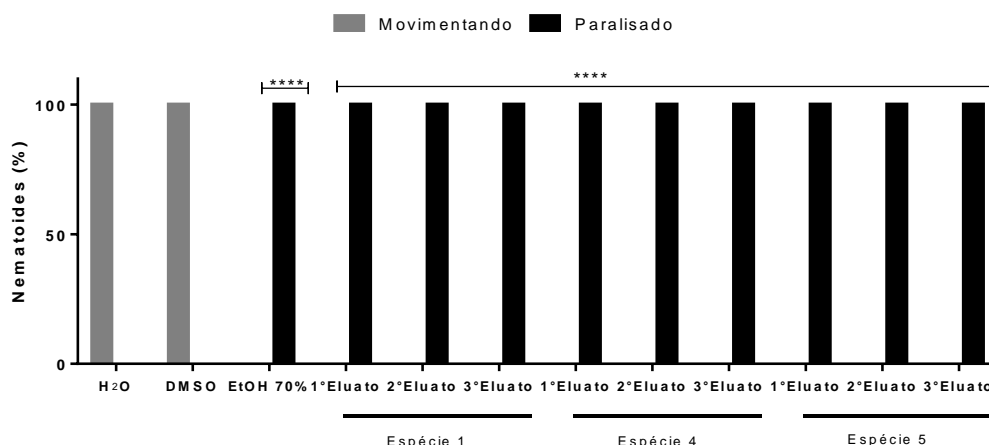


Figura 11. Bioensaio de avaliação *in vitro* dos eluatos obtidos via cromatografia sólida, SPE-C18 sobre J₂ de *M. incognita*. Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo e positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos grupos de cada eluato quando comparado com controle negativo dH₂O e com eles mesmos. Barras com “****” não difere entre si, com: p<0,0001.

Após o ensaio de recuperação, que certifica a ação nematotóxica, pode-se destacar: eluatos da espécie 1: o eluato 1 apresentou atividade nematicida de 67% e o eluato 2 apresentou atividade nematicida de 86% sobre os juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. Dos eluatos obtidos da espécie 4, o eluato 2 foi o mais efetivo sobre os juvenis, apresentando atividade nematicida de 66%. Dos eluatos obtidos da espécie 5, observou-se atividade nematicida de 96% para o eluato 1 e 80% para o eluato 2. No entanto, vale destacar que, desses eluatos que apresentaram ação nematicida, os eluatos mais efetivos foram o eluato 2 da espécie 1, com atividade nematicida de 86%; o eluato 2 da espécie 4 com 66% de ação nematicida e o eluato 1 da espécie 5, com 96% de atividade nematicida sobre os juvenis de segundo estágio de *M. incognita* como demonstrado na Figura 12.

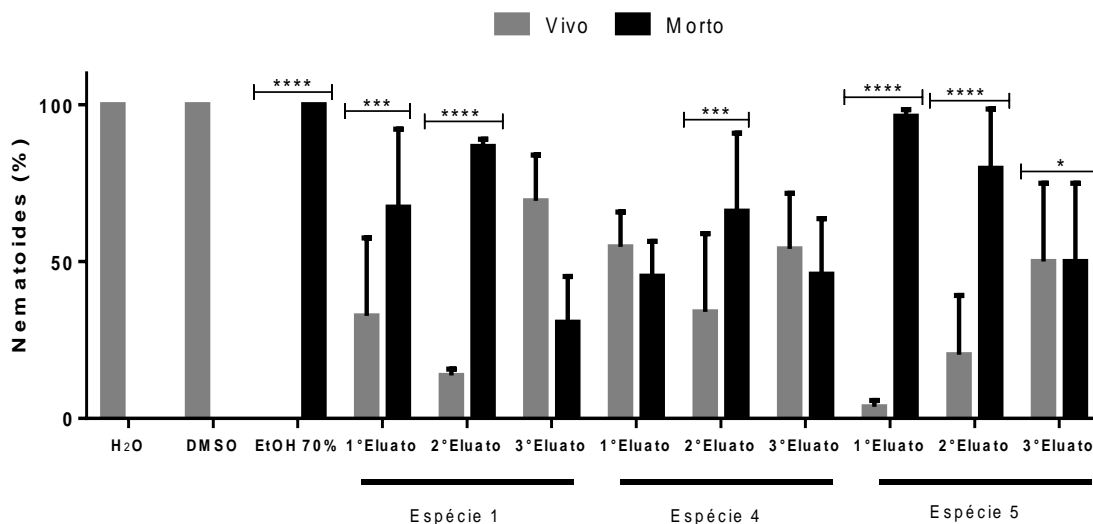


Figura 12. Ensaio de recuperação *in vitro* demonstrando o tipo de atividade nematocida e/ou nematostática dos eluatos das espécies 1, 4 e 5 sobre J₂ de *M. incognita*, após 24 horas de exposição em água. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa dos grupos quando comparados com controle negativo dH₂O. Barras contendo as mesmas quantidades de “*” não diferem entre si, com: ****: p<0,0001; ***: p<0,001 e *: p<0,05.

4.6. Purificação do eluato mais efetivo da espécie 5 via HPLC

Dentre os eluatos da espécie 5, o eluato 1 apresentou atividade mais proeminente no controle de J₂ de *M. incognita* em bioensaios conduzidos *in vitro*, portanto foi o material escolhido para a purificação via HPLC. A purificação gerou um cromatograma com 56 frações as quais foram organizadas em 7 grupos (Figura 13). No grupo 1 encontrou-se frações presentes entre os tempos 0 a 7 minutos de retenção; Grupo 2: frações presentes entre os tempos de 7 a 10 minutos de retenção; Grupo 3: frações presentes entre os tempos de 10 a 25 minutos de retenção; Grupo 4: frações presentes entre os tempos de 25 a 27 minutos de retenção; Grupo 5: frações presentes entre os tempos de 27 a 29 minutos de retenção; Grupo 6: frações presentes entre os tempos de 29 a 32 minutos de retenção; Grupo 7: frações

presentes entre os tempos de 32 a 45 minutos de retenção (Figura 13). Destes, apenas os grupos 1, 2 e 3, Figura 14, foram utilizados em bioensaios de viabilidade e ensaio de recuperação devido a quantidade de material obtido. Os demais grupos serão avaliados posteriormente em bioensaios específicos por não conterem material suficiente para bioensaios *in vitro* utilizando juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.

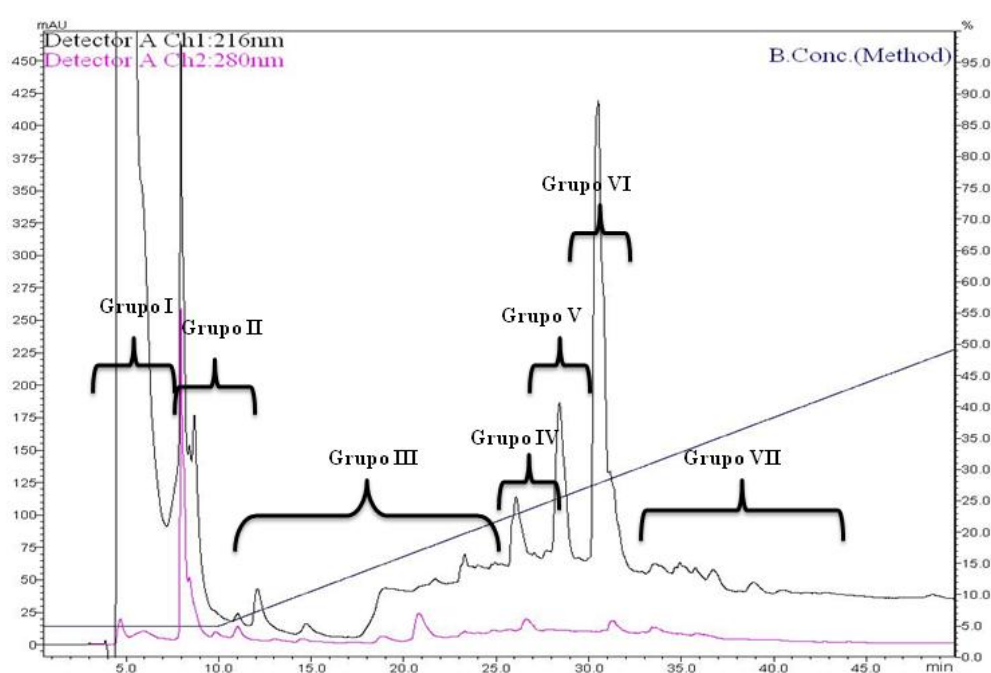


Figura 13. Cromatograma do 1º Eluato da espécie 5 representando os 7 grupos.

4.7. Ação nematotóxica do eluato nematicida da espécie 5 via HPLC

O resultado do bioensaio *in vitro* de viabilidade de frações contidas no grupo 1 ($300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) não apresentou efeito sobre os J_2 , após 48 horas de exposição (Figura 14), com 100% dos juvenis movimentando. Em relação as frações contidas no grupo 2, 100% dos juvenis presentes estavam paralisados (Figura 14). Para as

frações contidas no grupo 3, constatou-se que, 65% dos juvenis presentes ficaram paralisados (Figura 15), após 48 horas de exposição.

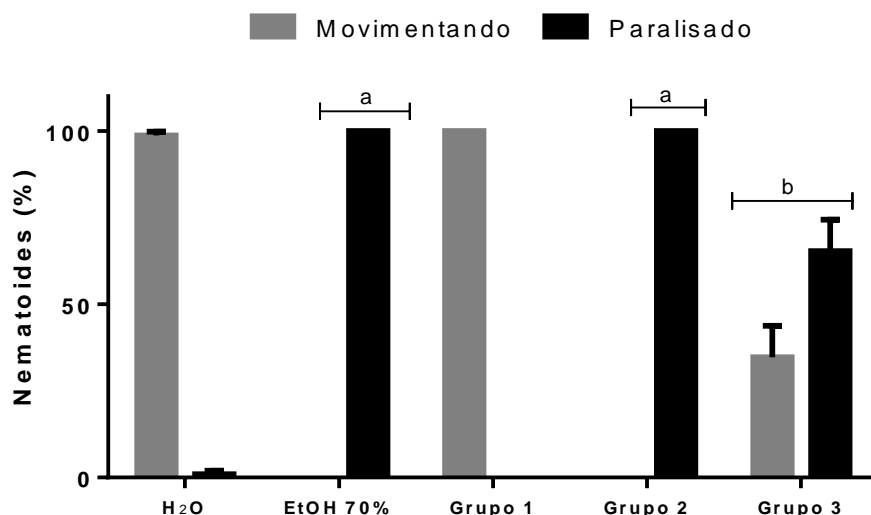


Figura 14. Bioensaio *in vitro* utilizando os grupos 1, 2 e 3 contidos no eluato 1 do ECA de raiz de planta da espécie 5 sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo e controle positivo água e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós-teste Tukey. Diferença significativa quando comparado os grupos “a” e “b” com controle negativo H₂O: Barras contendo letra iguais não difere entre si, com: $p < 0,0001$.

Após o ensaio de recuperação verificou-se um efeito nematostático para os grupos 2 e 3 com aproximadamente 100% J₂ recuperando a motilidade após 24 horas em água (Figura15).

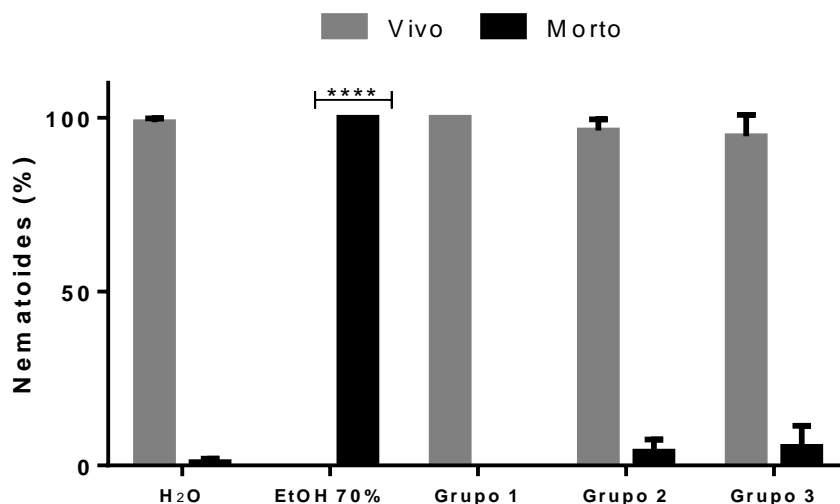


Figura 15. Ensaio *in vitro* de recuperação demonstrando atividade nematicida nematostática dos grupos 1, 2 e 3 sobre J₂ de *M. incognita*, após 24 horas de exposição em água. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com o controle negativo.****: $p < 0,0001$.

4.8. Avaliação em casa de vegetação dos juvenis de segundo estágio (J₂) após exposição de 48 horas aos ECAs das espécies 4 e 5 em diferentes concentrações

Após trinta dias da inoculação de plantas de tabaco com 1000 J₂ de *M. incognita* \pm 5, expostos previamente por quarenta e oito horas a tratamento com os extratos de raízes de plantas das espécies 4 e 5 da família Solanaceae, verificou-se potencial de redução da infecção das plantas para o ECA espécie 5. Neste aspecto, conforme aumentou as doses do ECA da espécie 5, houve redução significativa da infecção dos juvenis nas plantas, reduzindo-a praticamente a zero no tratamento com 3 mg.ml⁻¹, o que é comparável aos resultados obtidos no tratamento testemunha com Aldicarbe (Tabela 2).

As plantas do tratamento da testemunha água apresentaram começo de floração (Figura 16), nos demais tratamentos não foi observado o mesmo padrão de floração apresentado no controle água. As plantas do tratamento da testemunha

negativa, plantas inoculadas com 1000 ± 5 juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, constatou-se presença de massas de ovos e galhas (Figura 17). As plantas inoculadas com os juvenis submetidos após 48 horas de exposição aos ECAs das espécies 4 e 5 quando comparadas com as plantas contidas no grupo da testemunha do controle negativo, observou-se redução no número de galhas radulares e de massa de ovos.

As plantas contidas no grupo do tratamento ECA da espécie 4, observou-se redução na infecção dos juvenis, porém, para diquirir resultados mais satisfatórios é necessário maior dose do ECA desta espécie. As médias do comprimento da haste do grupo das plantas contidas no tratamento da testemunha com água indicaram desenvolvimento comparável às demais plantas contidas nos demais tratamentos, possível ausência de ação fitotóxica dos ECAs das espécies 4 e 5 (Tabela 2).

Quanto ao número de galhas e massas de ovos, nitidamente observa-se que, com o aumento das doses dos extratos a que foram submetidos os nematoides inoculados, houve redução da infecção, indicando ação nematóxica dos extratos, sendo o mais efetivo o ECA da espécie 5, concentrações de 2 e 3mg/ml^{-1} (Tabela 2).



Figura 16. Plantas de tabaco do grupo de tratamento da testemunha água: (A) tabaco apresentando início de floração; (B) raízes de tabaco assintomáticas (Fotos: Adriana A. Ferreira).

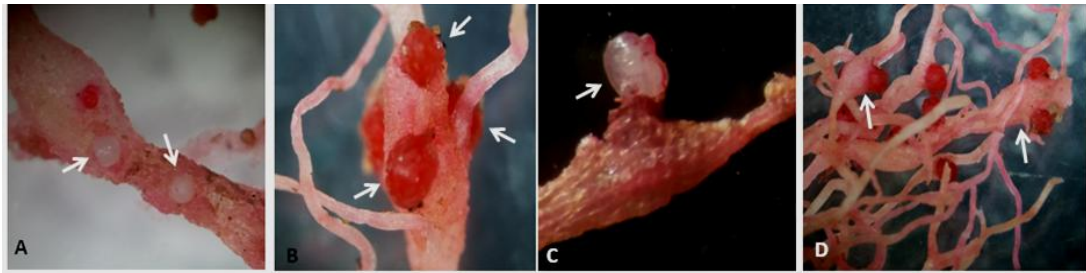


Figura 17. Sintomas e sinais resultantes da interação nematoide-raiz de tabaco. Em (A) fêmeas sedentárias de *Meloidogyne incognita* com corpo dentro da raiz, em (B) massa de ovos depositadas externamente a raiz de tabaco por fêmeas de *M. incognita*, em (C) fêmea de *M. incognita* com parte do corpo fora em raiz de tabaco, em (D) sintomas de galhas radiculares em raiz de tabaco provocado por fêmeas de *M. incognita* (Fotos: Adriana A. Ferreira).

Tabela 2. Médias de comprimento de haste (Comp. Haste), Número de Massas de Ovos (NMO), Número de Galhas (NG), Fator de Reprodução (FR) e Número de Ovos e/ou Juvenis de segundo estágio (J₂) por grama de raiz (NOJ₂/GR), obtidas em tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthii) para a espécie *Meloidogyne incognita* após 30 dias da aplicação dos tratamentos.

Tratamento *	Comp. haste	NMO	NG ²	FR	NOJ ₂ /GR
Test. Água	13,17	0	0	0	0
Test. Aldicarbe **	21,53	0	0	0,01	2,66
Test. Neg. **	11,97	149,00 ^a	120,00 ^a	2,41	645,88
ECA 4 (1 mg.ml ⁻¹) **	11,90	226,67 ^b	184,33 ^b	6,72 ^a	1755,89 ^a
ECA 4 (2 mg.ml ⁻¹) **	11,50	183,67 ^a	161,00 ^a	3,96	1276,81 ^b
ECA 4 (3 mg.ml ⁻¹) **	9,27	61,67	58,00	0,70	235,14
ECA 5 (1 mg.ml ⁻¹) **	16,93	153,33 ^a	143,33 ^a	3,37	697,20
ECA 5 (2 mg.ml ⁻¹) **	13,70	14,00	13,33	0,25	48,45
ECA 5 (3 mg.ml ⁻¹) **	16,03	0,33	0,33	0,01	2,36

*Em que: Test. Água - Tratamento testemunha com água; Test. Aldicarbe - Tratamento testemunha com aplicação do inseticida Aldicarbe (Temik 150 ®) na dose de 280 mg.kg⁻¹ de solo ; Test. Neg. - Tratamento testemunha com aplicação de suspensão de J₂ ; ECA 4 (1 mg.ml⁻¹) - Tratamento de suspensão de J₂ com extrato cru aquoso da espécie 4 na concentração de 1 mg.ml⁻¹ de suspensão; ECA 4 (2 mg.ml⁻¹) - Tratamento de suspensão de J₂ com extrato cru aquoso da espécie 4 na concentração de 2 mg.ml⁻¹ de suspensão; ECA 4 (3 mg.ml⁻¹) - Tratamento de suspensão de J₂ com extrato cru aquoso da espécie 4 na concentração de 3 mg.ml⁻¹ de suspensão; ECA 5 (1 mg.ml⁻¹) - Tratamento de suspensão de J₂ com extrato cru aquoso da espécie 5 na concentração de 1 mg.ml⁻¹ de suspensão; ECA 5 (2 mg.ml⁻¹) - Tratamento de suspensão de J₂ com extrato cru aquoso da espécie 5 na concentração de 2 mg.ml⁻¹ de suspensão; ECA 5 (3 mg.ml⁻¹) - Tratamento de suspensão de J₂ com extrato cru aquoso da espécie 5 na concentração de 3 mg.ml⁻¹ de suspensão.

**Inoculação inicial com 1000 ovos e/ou J₂ de *M. incognita*.

- NMO, NG*, FR e NOJ₂/GR: One-way ANOVA- “a” e “b” são diferentes do controle e são diferentes entre si, com valor de p<0,05.

4.9. Avaliação da fitotoxicidade sobre a germinação de sementes de soja (*Glycine max*)

As sementes de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, contidas no meio MS (controle negativo) e no meio MS contendo (1mg/ml^{-1}) dos ECAs de raízes das espécies 1, 4 e 5 da família Solanaceae germinaram normalmente (Figura 18). Este resultado demonstrou que para as concentrações dos ECAs que exibem atividade nematicida (1mg/ml^{-1}) sobre J_2 de *M. incognita* nenhum efeito fitotóxico foi observado para as sementes tratadas após 12 dias da semeadura. As plântulas de soja incluindo as do controle negativo e as dos tratamentos com os ECAS foram avaliadas em relação ao comprimento do colo ao ápice, peso fresco e peso seco da raiz e peso fresco e peso seco total (Tabela 3). O resultado destas análises mostrou que as plântulas de soja do controle negativo apresentaram comprimento do colo ao ápice acentuadamente menores ($58,1\pm 29,0$ mm) do que aquelas observadas para os ECAs das espécies 1 ($114,69\pm 31,4$ mm), 4 ($108,49\pm 61,3$ mm) e 5 ($107,02\pm 30,7$ mm) (Tabela 3). Em relação ao peso fresco da raiz, as plântulas do controle negativo apresentaram $0,54\pm 0,08$ g contra $0,59\pm 0,38$ g, $0,72\pm 0,20$ g e $0,59\pm 0,11$ g para os ECAs das espécies 1, 4, e 5 respectivamente, (Tabela 3).

Para o peso seco da raiz foi observado o valor de $0,05\pm 0,00$ g para as plântulas do controle negativo e $0,06\pm 0,03$ g; $0,06\pm 0,02$ g e $0,07\pm 0,01$ g para os ECAS das espécies 1, 4, e 5 (Tabela 3). O peso fresco total das plântulas do controle apresentaram $1,28\pm 0,23$ g contra $1,67\pm 0,62$ g; $1,81\pm 0,58$ g e $1,62\pm 0,32$ g para os ECAs das espécies 1, 4 e 5 (Tabela 3). Por fim o peso seco total observado para as plantas do controle negativo de $0,20\pm 0,01$ g, não diferiram estatisticamente das plântulas contidas nos ECAs das espécies 1, 4 e 5 (Tabela 3). Teste ANOVA Two-

way com pós teste Tukey. Não há diferença significativa entre os valores de cada parâmetro. One-way ANOVA com $p < 0,05$.

Tabela 3. Avaliação de fitotoxicidade das variáveis das plântulas de soja submetidas a 1 mg dos ECAS das espécies 1, 4 e 5 em meio MS 12 dias após a semeadura.

TRATAMENTOS	M-C-A (mm)	P-F/ Raiz (g)	P-F/ Total (g)	P-S/ Total (g)	P-S/ Raiz (g)
Controle/Neg.	58,1±29,0	0,54±0,08	1,28±0,23	0,20±0,01	0,05±0,00
Espécie 01	114,69±31,4	0,59±0,38	1,67±0,62	0,20±0,04	0,06±0,03
Espécie 04	108,49±61,3	0,72±0,20	1,81±0,58	0,22±0,02	0,06±0,02
Espécie 05	107,02±30,7	0,59±0,11	1,62±0,32	0,20±0,02	0,07±0,01

M-C-A: Medida colo ao ápice, **P- F:** peso fresco, **P-S:** peso seco.

- Não há diferença significativa entre os valores de cada parâmetro. One-way ANOVA com $p < 0,05$.



Figura 18. Plântulas de soja germinadas de sementes (A) 12 dias após a semeadura em meio MS, em (B) as mesmas plântulas destacando o comprimento das raízes bem como o crescimento da haste (Fotos: Adriana Andrade Ferreira).

4.10. Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias

A avaliação hemolítica foi realizada com os ECAs de raiz das cinco espécies de plantas da família Solanaceae em uma concentração de (500 µg/300 µl). Dentre os ECAs avaliados, apenas o ECA da espécie 1 apresentou alto índice de lise celular, rompendo em média 85% das hemácias suínas (Figura 19). Para os demais ECAs testados, não foi observada hemólise, permanecendo límpida a solução de NaCl com as hemácias, absorvância mantendo-se entre 0,01 e 0,1nm, certificando desta forma, a completa ausência de ruptura das hemácias as quais permaneceram íntegras no fundo da placa de ELISA (Figura 19).

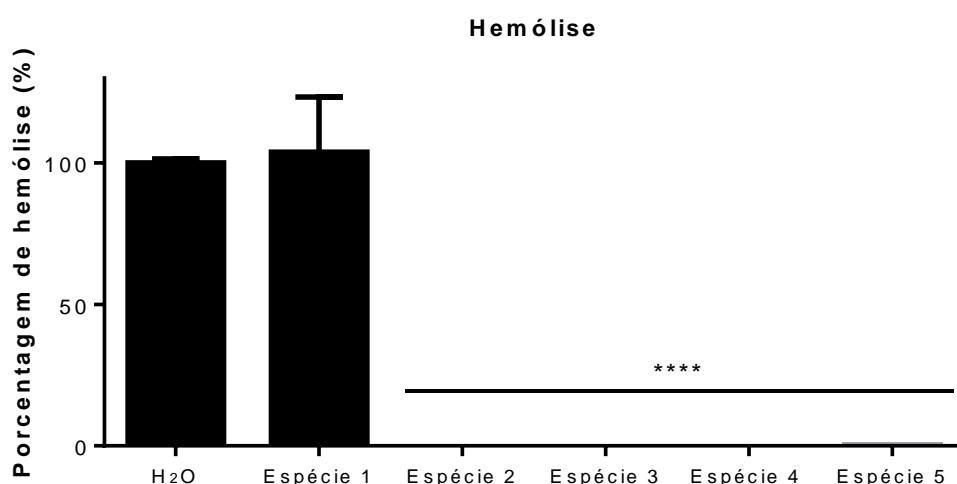


Figura 19. Avaliação de citotoxicidade *in vitro* utilizando ECAs das cinco espécies de solanáceas sobre hemácias suínas (500 µg/300 µl). Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle positivo dH₂O. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. One-way ANOVA. Diferença significativa quando comparado os tratamentos das espécies 2, 3, 4, e 5 com controle H₂O. Espécie 1 não houve diferença significativa quando comparado com o controle H₂O. Barra contendo “****” não difere entre si, com: p<0,0001.

4.11. Avaliação de citotoxicidade sobre fibroblastos (NIH3T3)

A ação de toxicidade dos ECAs das espécies de plantas (1, 2, 3, 4 e 5) com concentrações de (250, 500, 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g/ml}^{-1}$) foi avaliada em bioensaio *in vitro* de viabilidade celular utilizando (MTT) e a linhagem de fibroblastos (NIH3T3) isolados de mamífero. Os resultados demonstraram que os ECAS das espécies (1, 2, 4 e 5) foram bastante citotóxicos, inviabilizando acima de 70% das células de fibroblasto para todas as concentrações utilizadas. Inversamente, o ECA da planta 3, apresentou uma menor toxicidade com apenas 20% das células inviabilizadas, após 24 horas de exposição (Figura 20). Resultado similar foi observado quando fibroblastos ficaram expostos por um período de 48 horas utilizando exatamente as mesmas amostras e concentrações (Figura 21).

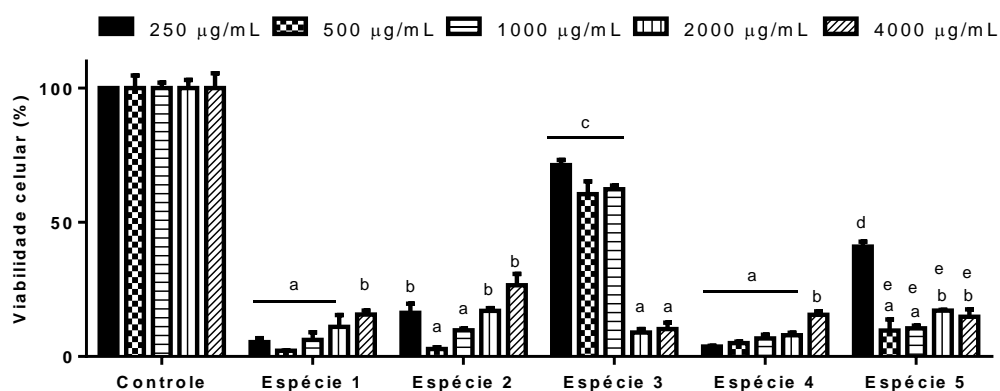


Figura 20. Citotoxicidade das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 em fibroblastos (NIH3T3) isolados de mamífero após 24 horas de exposição nas concentrações de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 µg/ml. Diferença significativa quando comparados os grupos “a”, “b”, “c”, “d” e “e” entre si pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste Tukey $p < 0,05$.

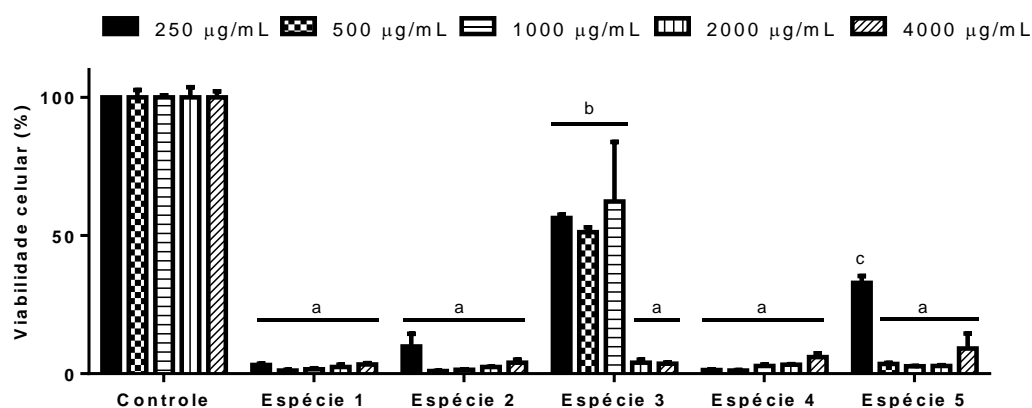


Figura 21. Citotoxicidade das espécies 1, 2, 3, 4 e 5 em fibroblastos (NIH3T3) isolados de mamífero após 48 horas de exposição nas concentrações de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 µg/ml. Diferença significativa quando comparados os grupos “a”, “b” e “c” entre si pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste Tukey, com: $p < 0,05$. Barras contendo letras iguais não diferem entre si, com: $p < 0,0001$.

4.12. Avaliação da especificidade sobre organismos não alvo

4.12.1. Bactérias benéficas presentes na rizosfera

Nos bioensaios de especificidade utilizando organismos não alvo, os ECAs das cinco espécies de solanáceas com concentração de (1mg/ml^{-1}) foram avaliados contras as bactérias da rizosfera *Azospirillum brasiliense* (AbV6) (Figura 22) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080) (Figura 23). Os resultados demonstraram que todos os ECAs foram inócuos contra os microrganismos avaliados, comprovado pela completa ausência de halo ao redor dos discos contendo os ECAs (Figuras 22 e 23) .

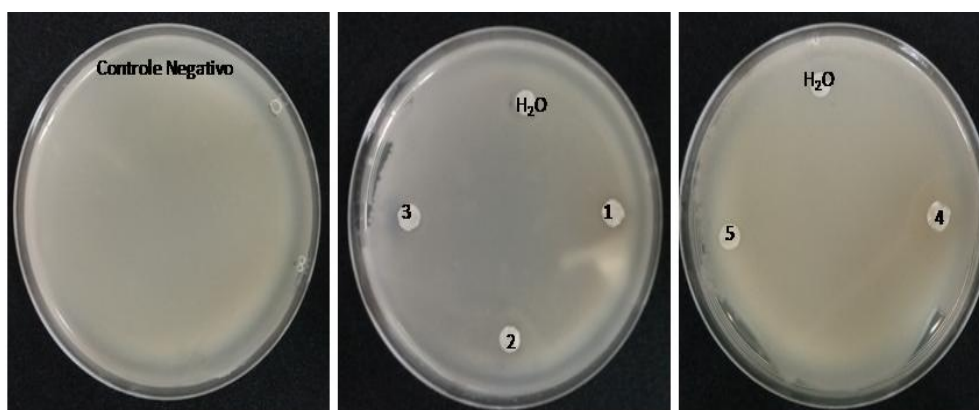


Figura 22. Bioensaio *in vitro* usando ECAs de raízes das cinco espécies de plantas da família Solanaceae sobre a bactéria *Azospirillum brasiliense* (AbV6), multiplicada sobre meio DYGS, onde os números representados nos discos de papel correspondem aos ECAs das espécies 1, 2, 3, 4 e , 5 respectivamente (Fotos: Adriana A. Ferreira).

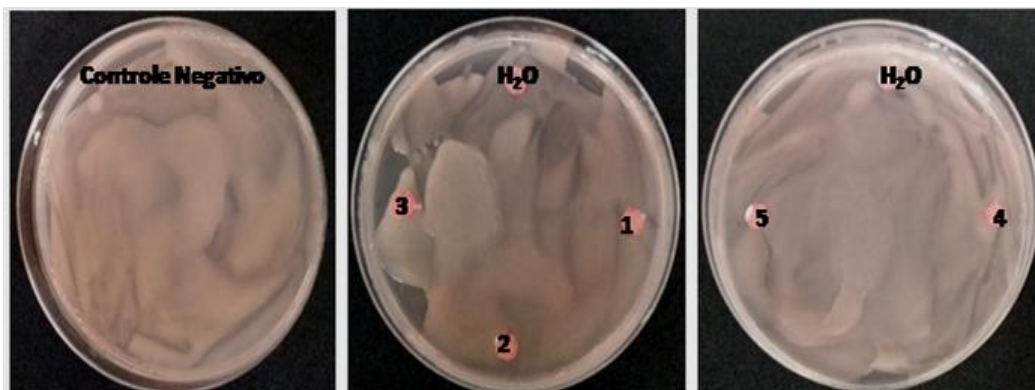


Figura 23. Bioensaio *in vitro* usando ECAs das cinco espécies de plantas da família Solanaceae sobre o crescimento de *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080), crescidos sobre o meio YMA, onde os números representados nos discos de papel 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem aos ECAs de raízes das espécies 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Fotos: Adriana A. Ferreira).

4.12.2. Fungos benéficos - *Trichoderma asperellum* e *T. harzianum*

Os ECAs de raízes das cinco espécies de solanáceas com concentração de 15mg/ml^{-1} também foram avaliados contra os fungos *Trichoderma asperellum* (CEN 759) e *Trichoderma harzianum* (CEN 766). De acordo com os resultados, o ECA da espécie 1 inibiu o crescimento de ambas as espécies de fungos avaliados (Figura 24B) e (Figura 25B) quando comparados com o controle negativo conforme apresentado na (Figura 24A e Figura 25A). Os demais ECAs não apresentaram efeito sobre o crescimento micelial de *Trichoderma asperellum* (Figuras 24 C, D, E, E, F) e *Trichoderma harzianum* (Figura 25 C, D, E e F). A taxa de inibição do crescimento micelial foi mensurada mediante avaliações diárias usando paquímetro digital e pode ser visualizada na Figura 26.

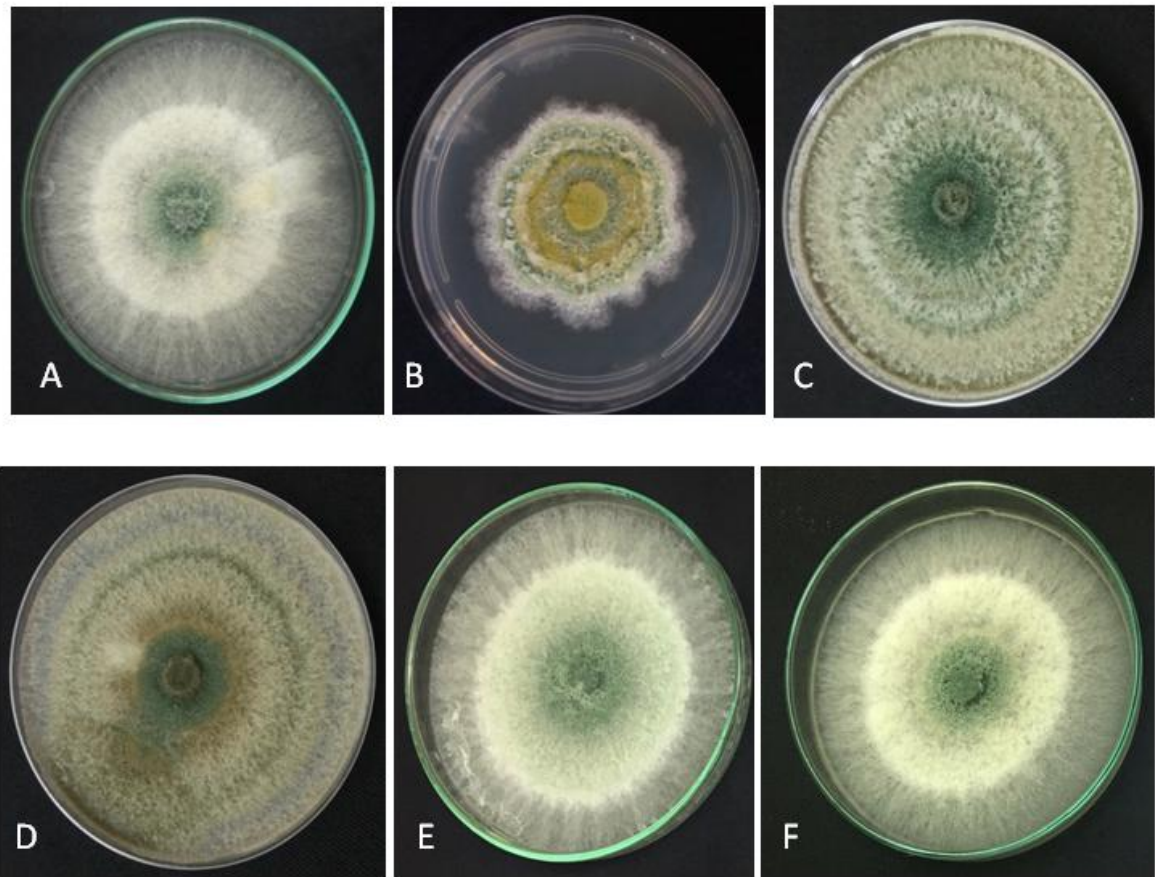


Figura 24. Crescimento micelial de *Trichoderma asperellum* em meio Batata dextrose ágar com 15 mg de um dos cinco ECAs de raízes de plantas da família Solanaceae: (A) controle negativo; (B) ECA espécie 1; (C) ECA espécie 2; (D) ECA espécie 3; (E): ECA espécie 4; (F): ECA espécie 5 (Fotos: Adriana A. Ferreira).

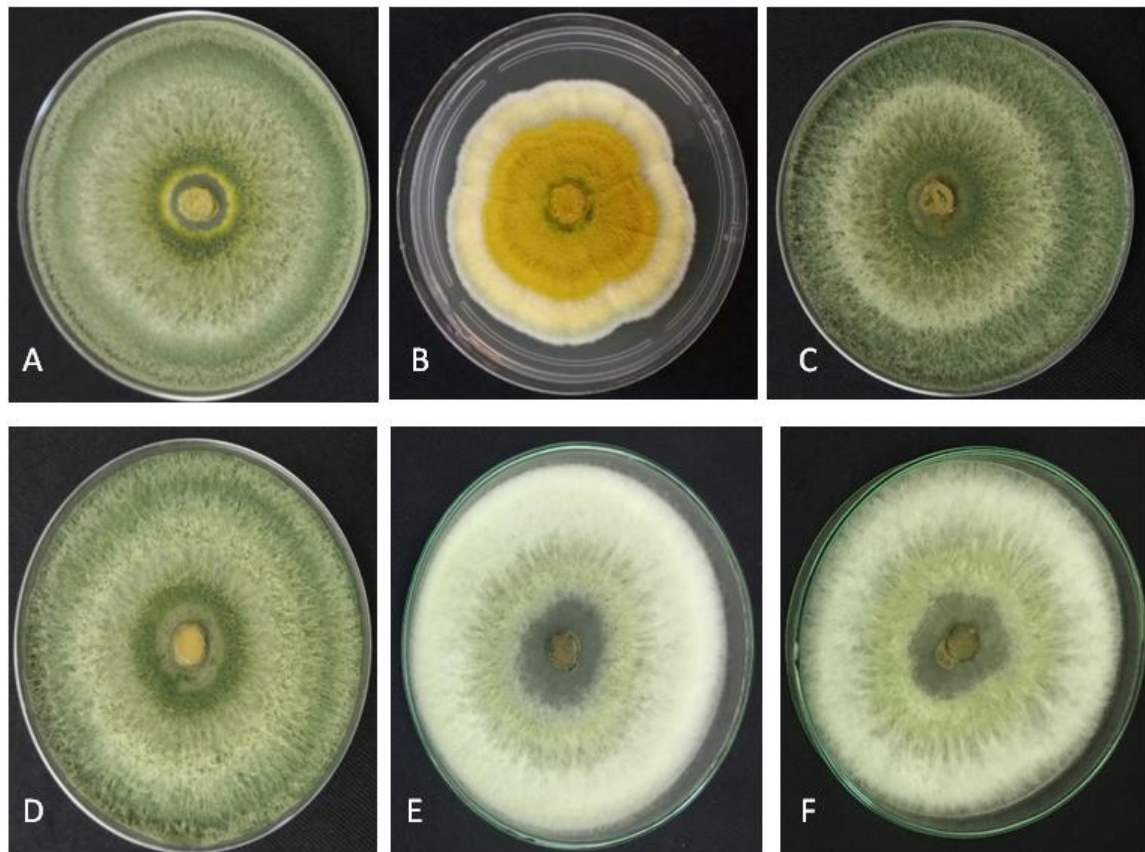


Figura 25. Crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* em meio Batata dextrose agar com 15 mg de um dos cinco ECAs de raízes de plantas da família Solanaceae: (A) controle negativo; (B) ECA espécie 1; (C) ECA espécie 2; (D) ECA espécie 3; (E): ECA espécie 4; (F): ECA espécie 5 (Fotos: Adriana A. Ferreira).

Após três dias de crescimento de *T. asperellum* e *T. harzianum* mantidos em contato com os ECAs da espécie 1, verificou-se que houve uma diferença no crescimento de micélio de ambas as espécies (Figura 24 e Figura 25). No entanto, as placas que sofreram inibição do crescimento micelial apresentaram uma maior esporulação conidial.

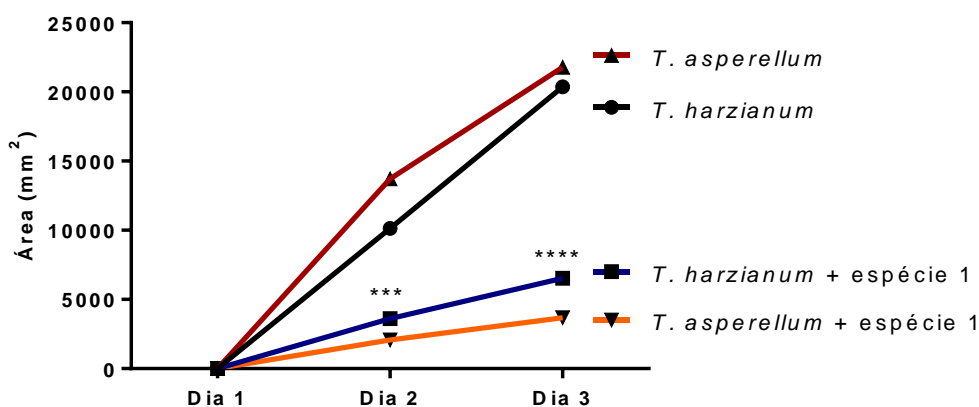


Figura 26. Mensuração da inibição do crescimento micelial de *T. harzianum* e *T. asperellum* durante três dias de crescimento sobre meio batata dextrose ágar acrescido de 15 mg do ECA espécie 1. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com controle ****: $p < 0,0001$ e ***: $p < 0,001$.

Devido a interferência observada no crescimento micelial nas placas que continham o ECA da espécie 1 sobre *T. asperellum* e *T. harzianum*, adicionalmente foi realizada também uma avaliação do vigor conidial dessas espécies. Após 16 horas da transferência da solução contendo os conídios de ambos, inclusive do controle negativo de cada espécie de *Trichoderma* foi realizada a contabilização dos conídios germinados. Verificou-se que, apesar da inibição ocasionada no crescimento micelial pela adição do ECA da espécie 1 em ambas as espécies de *Trichoderma*, não foi observado alteração no processo de germinação desses conídios (Figura 27B), quando comparado com o controle negativo (Figura 27A), indicados nas setas.

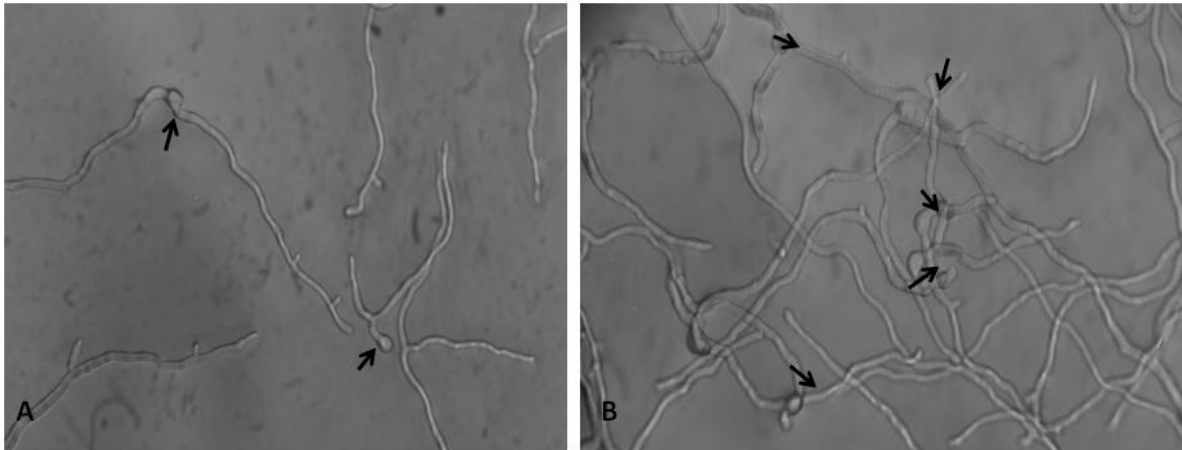


Figura 27. Germinação dos conídios e o desenvolvimento de micélio de *Trichoderma asperellum* do controle negativo em (A) indicados nas setas, e em (B) germinação dos conídios e o desenvolvimento de micélio após tratamento com 15 mg do ECA da espécie 1, indicados nas setas após 16 horas de crescimento. Escala das fotos: 5 μ m (Fotos: Adriana A. Ferreira).

Em relação ao resultado do crescimento de *T. harzianum*, observou-se que a germinação dos conídios bem como a formação de tubos germinativos tratados com 15 mg do ECA da espécie 1, apresentaram um maior desenvolvimento quando comparados com o controle (Figura 28A), após 16 horas de crescimento em meio BDA observados sobre lâmina microscópica. Apesar da inibição do crescimento micelial ocasionada pela adição do ECA da espécie 1 observada após três dias de crescimento em placa de Petri, os conídios presentes não sofreram alteração em seu processo de germinação (Figura 28B).

Quanto aos tubos germinativos formados após 16 horas (Figura 28B), constatou-se maior desenvolvimento quando comparados com os tubos germinativos do controle (Figura 28A). Apesar do ECA da espécie 1 ter inibido o crescimento micelial em ambas as espécies do *Trichoderma*, esse mesmo ECA não foi capaz de interferir no processo de germinação dos conídios presentes em cada placa, fato observado quando comparamos os tratamentos com os devidos controles (Figura 27 e 28).

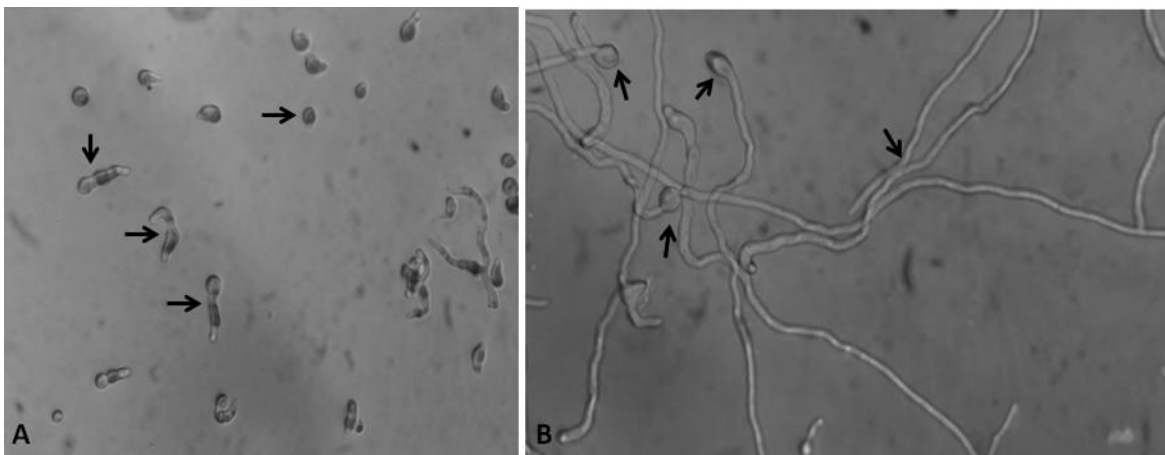


Figura 28. Germinação dos conídios de *Trichoderma harzianum* do controle negativo indicados nas setas em (A) e em (B) germinação dos conídios e o desenvolvimento de tubos germinativos maiores, indicados nas setas, após tratamento com 15 mg do ECA da espécie 1, após 16 horas de crescimento sobre lâmina. Escala das fotos: 5µm (Fotos: Adriana A. Ferreira).

4.12.3. Levedura benéfica - *Candida maltosa* CA 49

Os extratos das cinco espécies de solanáceas adicionados sobre os discos de papel filtro sobre meio YPD ágar não interferiram no crescimento de *Candida maltosa* CA 49 após 24 horas de crescimento, com ausência de halo de inibição ao redor dos discos de papel, o que pode ser observado na Figura 29.

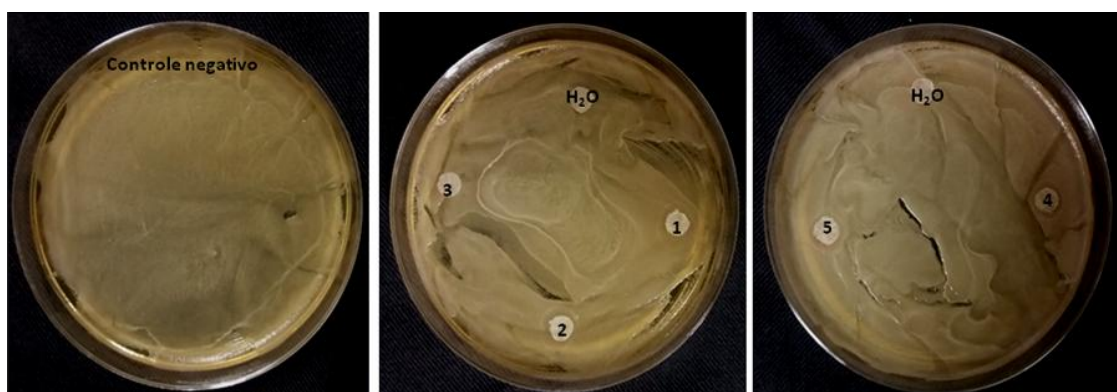


Figura 29. Bioensaio *in vitro* usando os ECAs das cinco espécies de plantas da família Solanaceae sobre o crescimento de *Candida maltosa* CA 49. Os números (1, 2, 3, 4 e 5) representados nos discos de papel correspondem aos extratos usados dos ECAs das respectivas espécies (Fotos: Adriana A. Ferreira).

4.13. Purificação do extrato cru aquoso da espécie 1 via UPLC-PDA

O ECA da espécie 1 foi primeiramente purificado em coluna de fase reversa C-18 por HPLC, porém a quantidade de material existente em cada fração cromatográfica apresentou concentrações muito baixas (dados não mostrados). Devido a esse fator, o mesmo material foi submetido à purificação via UPLC-PDA. O resultado demonstrou um cromatograma com uma fração majoritária no tempo de retenção de 22 minutos com absorvância em 0.160 AU referente à classe química das cumarinas (Figura 30). A referida fração foi analisada em espectro UV e revelou uma substância denominada escopoletina (Figura 31).

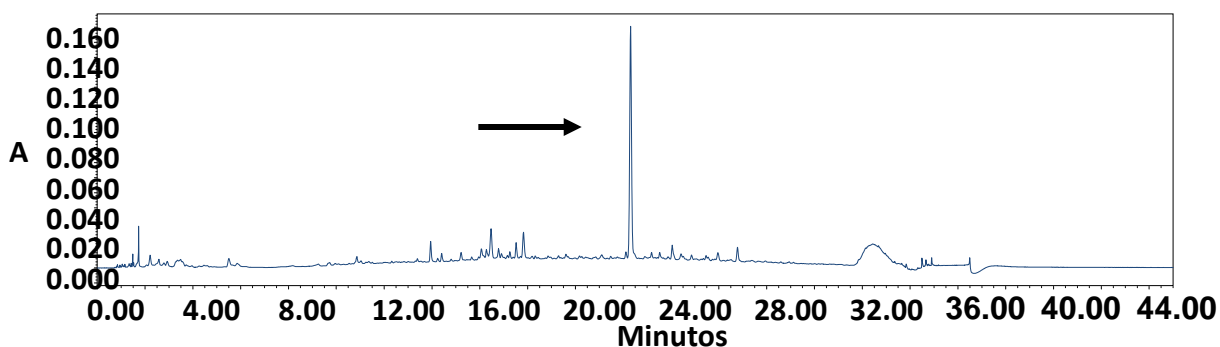


Figura 30. Espectro do extrato cru aquoso de raiz da espécie 1, onde o maior pico representa uma cumarina. A análise foi realizada utilizando UPLC/PDA coluna: Acquity UPLC® HSS T3 C18 1,8 μm 2,1x150 mm; Temperatura da coluna: 40°C; Fase móvel - solvente A: H₂O Milli-Q/TFA 0,1%; solvente B: Acetonitrila/TFA 0,1%.

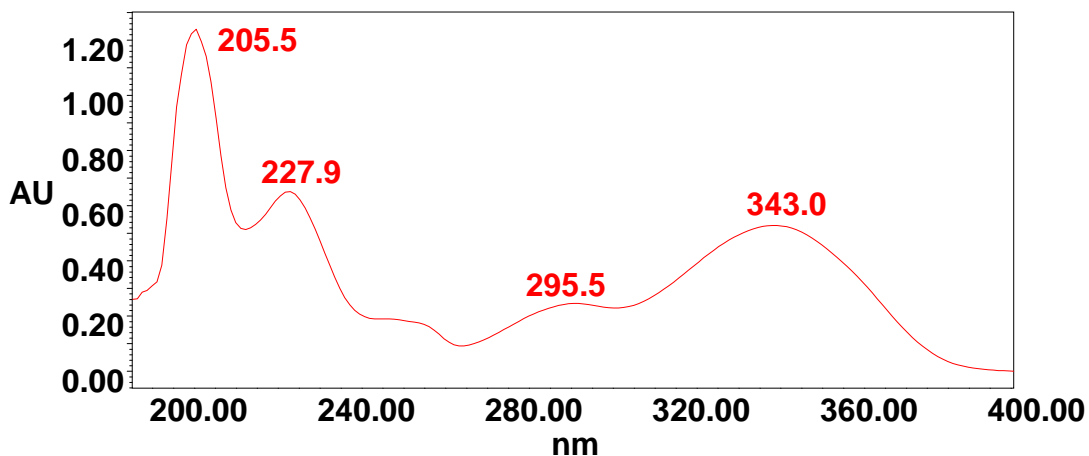


Figura 31. Espectro UV referente ao pico cromatográfico indicado na seta preta (Figura 30) com tempo de retenção em 22 minutos, indicando a presença de escopoletina (Bhatt *et al*, 2011).

4.14. Bioensaio *in vitro* da fração cromatográfica identificada (Escopoletina)

A escopoletina identificada via UPLC/PDA e a escopoletina adquirida da SIGMA Aldrich® foram submetidas a bioensaio *in vitro* utilizando J₂ de *M. incognita*. A escopoletina identificada (50µg.ml⁻¹) foi capaz de paralisar apenas 20% dos J₂ contra 1 % para a escopoletina obtida da SIGMA (Figura 32).

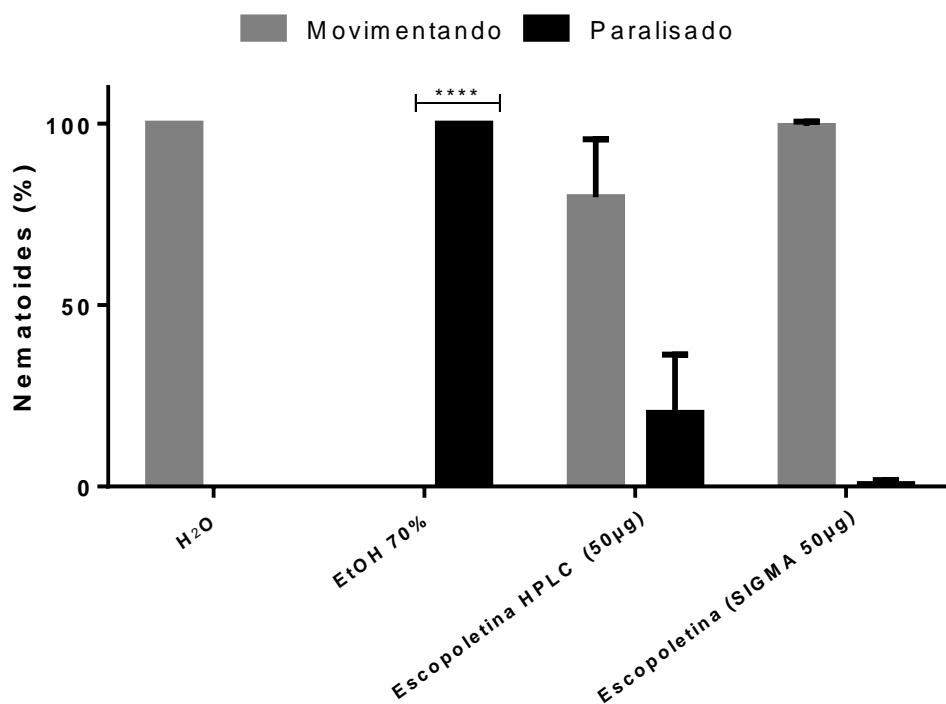


Figura 32. Bioensaio *in vitro* utilizando composto identificado via UPLC/PDA e o composto adquirido da SIGMA com concentração de ($50\mu\text{g}.500\mu\text{L}^{-1}$) sobre J₂ de *M. incognita*, onde permaneceram por 48 horas em exposição. Bioensaio realizado em triplicata, tendo como controle negativo e positivo água destilada e etanol 70%. Teste ANOVA Two-way com pós teste Tukey. Diferença significativa quando comparado com o controle negativo****: $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

Os resultados dos ECAs provenientes de raízes de plantas pertencentes a família Solanaceae submetidos a bioensaios de viabilidade, foram considerados nematicidas quando capazes de matar acima de 70% dos juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*. A definição quanto à atividade ser nematicida e/ou nematostática podem estar diretamente relacionadas com a alta concentração de um determinado composto ativo, ou sinergismo entre diferentes compostos presentes em cada ECA, estando a ação diretamente relacionada com a dosagem desses componentes químicos sobre esses juvenis. Resultados de atividade nematicida semelhantes sobre J₂ de *M. incognita*, foram encontrados por Dias e colaboradores (2000), ao avaliarem extratos aquosos de diversas plantas medicinais, obtidos por meio de processos de infusão e maceração. Estes autores ressaltam que a presença de atividade nematostática durante bioensaio de viabilidade não necessariamente implicará numa atividade nematicida no bioensaio de recuperação, enfatizando a necessidade da realização do referido ensaio. Dentre os extratos avaliados, os autores afirmam que o extrato de losna (*Artemisia absinthium* L.) foi um dos mais eficientes, com atividade nematicida variando de 90% a 99%. Resultados semelhantes foram obtidos por Korayem (1999) e colaboradores, que constataram atividade nematicida de 100% para a mesma planta. Os resultados obtidos ao avaliar os cinco ECAs de raiz das espécies de plantas da família Solanaceae estão em concordância com os resultados supracitados, reforçando a importância do bioensaio de recuperação.

A atividade nematicida presente nos ECAs das cinco espécies de solanáceas avaliadas pode estar relacionado a presença de metabólitos secundários de distintas classes químicas como alcaloides, taninos, terpenos, triterpenos, flavonoides entre outros compostos que já foram previamente citados na literatura para plantas da família

Solanaceae por Ntalli & Caboni (2012), Hawkes (1999), Checon (2011), Silva (2003) e colaboradores, Eich (2008) e Silva (2017), e que podem estar diretamente associados com a presença da ação nematicida. 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). Salgado e Campos (2003), também encontraram evidências de substâncias tóxicas a nematoides do gênero *Meloidogyne*, em especial *M. exigua* em plantas como cravo da índia e canela. Vale destacar que segundo Wiratno e colaboradores (2009), é possível encontrar ação nematicida em diferentes partes das plantas como: broto, folha, rizoma, flor, semente, raiz, grãos e caule. A exemplo de *Nicotiana tabacum*, *Syzygium aromaticum* L., *Piper betle* L., e *Acorus calamus* L.

Ao avaliar a atividade térmica dos cinco ECAs a uma temperatura de 50 °C em bioensaio *in vitro* utilizando J₂ de *M. incognita*, observou-se que somente o ECA da espécie 3 perdeu atividade nematicida, anteriormente expressa em 85% de ação sobre os juvenis de *M. incognita*. Esses resultados demonstram propriedade bifuncional relacionada à estabilidade térmica e a capacidade nematotóxica existentes nos ECAs de raízes de espécies de plantas da família Solanaceae, alvos desta pesquisa. Vale reforçar que os dados disponíveis na literatura em relação à termoestabilidade de ECAs de plantas dessa família, em especial raízes são raros. No entanto, Rocha e colaboradores (2017a, 2017b), avaliaram a estabilidade térmica de extrato aquoso de semente *Canavalia ensiformis* e a composição do efeito sinérgico entre compostos nematotóxicos sobre *M. incognita*. Os extratos avaliados mantiveram a atividade nematicida mesmo depois de submetidos a temperaturas mais elevada, 50 °C.

A avaliação da ação dos ECAs sobre a inibição da eclosão dos juvenis foi também testada, demonstrando atividade inibitória de 99% dos juvenis de *M. incognita*. Esse resultado está em concordância com os resultados obtidos por Salgado & Campos (2003), que mostraram o efeito de extratos de plantas de gengibre, cravo-da-índia e canela sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne exigua* Göldi, 1892. Ainda, Khurma e Singh (1997), demonstraram inibição da eclosão de juvenis promovida por metabólitos secundários isolados de sementes de *Sesbania sesban* (L.) Merr., sobre *M. incognita* e *M. javanica*. Adegbite (2011) avaliou também a ação de extratos de folhas na inibição da eclosão de J₂ de *M. incognita* utilizando a concentração de 2,5% p/v (250g/10 litros água), de diferentes plantas, como *Azadirachta indica* seguido por *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Rob., *Nicotiana tabacum*, *Carica papaya* L., *Cannabis sativa* L., *Cassia alata* L., e *Vernonia amygdalina* Coll. Os referidos extratos (das espécies 1,4 e 5) foram eficazes na eclosão de *M. incognita*, além da ação nematicida sobre juvenis de segundo estágio. Esse resultado está em concordância também com a DL₅₀ de ambos os ECAs, onde a toxicidade desses materiais pode ser observada mediante a inibição da eclosão dos juvenis de *M. incognita*.

O fracionamento dos extratos das espécies 1, 4 e 5 foram realizados por técnicas cromatográficas utilizando SPE-C18. Essa técnica é um procedimento de separação que foi aplicada como sendo um fase pré-inicial para o isolamento/fracionamento de possíveis compostos essenciais das amostras oriundas dos extratos aquosos de raízes de plantas das espécies 1, 4 e 5. Por ser uma etapa de preparação seletiva e rápida, a SPE é aplicada a uma ampla gama de variedades de amostras biológicas, cumprindo o seguimento da química verde, permitindo então a seleção de material biológico com diferentes classes químicas. Além disso, o enriquecimento dos componentes do extrato podem ser realizado utilizando uma pequena quantidade de solvente orgânico durante o processo de diluição da fase sólida

(Szewczyk *et al*, 2015). O material oriundo dessa cromatografia apresentou atividade nematicida sobre os juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. A literatura é escassa de informações utilizando esta técnica com fins de seletividade de classes químicas com o intuito de descobrir classes e compostos nematotóxicos. Além desta técnica, SPE-C18, foi utilizada também a técnica de RP-HPLC, para um fracionamento mais detalhado e mais preciso. No entanto, apenas o eluato 1 oriundo da SPE-C18 da espécie 5 foi recromatografado por esta técnica, gerando num total de 56 frações, as quais foram organizadas em 7 grupos. Dos sete grupos, apenas os três primeiros foram testados sobre os J₂ de *M. incognita*. Apenas o grupo 2 e 3 apresentaram ação nematostática. Rocha e colaboradores (2017), ao purificar extrato aquoso de *C. ensiformis* utilizando a mesma técnica, RP-HPLC, verificou-se que das 22 frações presentes, 3 apresentaram ação nematicida e 2 frações apresentaram ação nematostática sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. A ação nematicida sobre juvenis pode estar associada ao sinergismo das moléculas/compostos presentes no conjunto de frações. Fato este observado no trabalho de Rocha e colaboradores (2017), após avaliarem a atividade nematicida resultante do sinergismo dos compostos identificados no extrato de *C. ensiformis* em bioensaios conduzidos *in vitro* e em casa de vegetação.

Assim, futuramente serão realizados experimentos de sinergismo entre as 56 frações obtidas do eluato 1 do ECA da espécie 5, bem como identificação de todas as moléculas presentes em cada eluato oriundo do ECA da espécie 5. Ainda assim, as moléculas identificadas de ambos os ECAs serão avaliadas sobre os J₂ de *M. incognita* até a descoberta de qual/quais moléculas possuem atividade nematicida sobre *M. incognita*.

A comprovação da atividade nematicida do ECA das espécies 4 e 5 foi comprovada também em casa de vegetação, constatando redução significativa no número de galhas nas raízes e de massa de ovos e de J₂ após o tratamento com o ECA da espécie 5, apresentando

fator de reprodução 0,01, número de massas de ovos 0,33 e número de galhas 0,33, não diferindo da testemunha positiva Aldicarbe, que apresentou número de massa de ovos, número de galhas radiculares 0 e o fator de reprodução 0,01. Este resultado está em concordância com os resultados obtidos no bioensaio *in vitro* (1mg/ml⁻¹), permanecendo a ação nematicida, com 99% de mortalidade após as 48 horas de exposição ao ECA. Os resultados do ECA da espécie 4 não serão descartados, porém, para o ECA da espécie 4 obter um resultado mais satisfatório em casa de vegetação, quando comparado com a testemunha positiva Aldicarbe, será necessário doses maiores que 3mg/ml⁻¹. Rocha e colaboradores (2017) encontraram resultados bem próximos ao avaliarem o dialisado externo de *C. ensiformis* (moléculas menores que 3.5 Kda) em casa de vegetação, com redução notável no número de massa de ovos e de galhas radiculares. Segundo os autores as massas de ovos diminuíram 82% para o tratamento com dialisado externo e 94,2% para o controle positivo utilizando o nematicida comercial (Aldicarbe) quando comparados com o controle negativo utilizando dH₂O. Gardiano 2006, afirma que o uso de extratos de plantas no controle de nematoides, seja em estudos *in vitro* ou em casa de vegetação tem apresentado bons resultados, sendo o modo de aplicação no solo. Martins & Santos (2016), observou os mesmos resultados ao avaliarem extratos obtidos por meio de infusão e maceração de agrião-do-brejo (*Eclipta alba* L. Hassk), alfavaca (*Ocimum basilicum* L.), artemísia (*Artemisia vulgaris* L.), capim citronela (*Cymbopogon winteranus* Jowitt), chambá (*Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leonard), confrei (*Symphytum officinale* L.), hortelã (*Mentha x villosa* Huds), lombrigueira (*Spigelia anthelmia* L.), mastruz (ou erva-de-santa-maria) (*Chenopodium ambrosioides* L.) e menta (*Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Holme), na motilidade e mortalidade de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. A efetividade dos extratos sobre os juvenis foi verificada em tomateiros, sendo inoculados após a exposição aos extratos, avaliando o número de galhas e de massas de

ovos. Os autores observaram que, após 45 dias os J₂ ativos expostos aos extratos de agrião-do-brejo induziram a formação de três a doze galhas, enquanto que os poucos juvenis que sobreviveram no extrato de lombrigueira provocaram de quatro a seis pequenas galhas nas raízes das plantas infectadas. Esse resultado está em concordância com os resultados adquiridos em casa de vegetação, ao avaliarem os J₂ expostos ao ECA da espécie 5, o qual apresentou uma redução significativa de massa de ovos e de galhas radiculares em plantas de tabaco. Ainda assim, vários autores citam extratos de diferentes espécies de vegetais como folhas e sementes de mamão (*Carica papaya* L.), de bulbilhos de alho (*Allium sativum* L.), extratos foliares de hortelã (*Mentha piperita* L.), de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), de melão de São Caetano (*Mormodica charantia* L.), de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), de orégano (*Origanum vulgare* L.) apresentando resultados satisfatórios no controle de nematoides fitopatogênicos em casa de vegetação (Coimbra *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2000; Gardiano *et al.*, 2011; Martins & Santos, 2016). Os resultados obtidos neste estudo também estão em concordância com os descritos por Sari *et al.* (2018), que ao avaliarem o potencial biofumigante de plantas das famílias Brassicaceae, Leguminosaceae e Solanaceae, constataram uma redução efetiva do número de galhas radiculares em plantas de batata com adição ao solo de biofumigantes advindos de Brassicaceae e Solanaceae, observando no entanto, que, apenas as solanáceas foram responsáveis por promover o crescimento das plantas de batata. Também no trabalho de Freitas e colaboradores (2000), foi observada a redução no número de galhas, número de ovos e de juvenis ao utilizarem compostos como capsaicina, capsaonoides e alil isotiocianato.

Os mesmos ECAs foram também avaliados quanto à fitotoxicidade sobre a germinação de sementes de soja. Após 12 dias em contato com os referidos ECAs, observou-se ausência de fitotoxicidade para todos os ECAs avaliados. Vale ressaltar que, as

plântulas que mantiveram em contato com os ECAs das espécies testadas, apresentaram valores mais elevados no comprimento do colo ao ápice, apresentando o dobro do crescimento, fator pode estar associado a presença de classes importantes de fitohormônios indutores do crescimento, como giberelinas, auxinas, citocininas e etileno (Tayz & Zieger, 2004) presentes nos ECAs avaliados. Ao comparar o peso seco total das plântulas que permaneceram em contato com os ECAS das plântulas presentes do controle, constatou-se que ambos os tratamentos mantinham a mesma variação de peso. Portanto, nenhum dos ECAs analisados causaram fitotoxicidade sobre a germinação das sementes de soja, resultado esse satisfatório para possíveis produtos nematicidas à base de moléculas naturais com propriedades nematicidas, as quais não possuem ação fitotóxica, oriundas de raízes de plantas, em especial, às da família Solanaceae, tendo como base as normas exigidas na Lei Nº Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989 e nas normas recomendadas para produtos fitossanitários com base orgânica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A fitotoxicidade pode-se manifestar em sintomas como folhas enrijecidas, quebradiças, de cor verde-pálido, geralmente menor, com pontos necróticos (Rickli *et al.*, 2011). Porém, Pereira (2017), ao avaliar a alelopatia de extratos aquoso e etanólico de parte aérea de *Canavalia ensiformis* (L.) DC., e extratos aquoso e etanólico de parte aérea e radicular de *Paspalum maritimum* Trind., demonstrou que o extrato aquoso das partes aéreas e o extrato etanólico de ambas as partes da planta, exibiu efeito alelopático em espécies receptoras. Porém o extrato aquoso das raízes de *P. maritimum* não possuiu efeito alelopático, corroborando com os resultados obtidos para todos os ECAS de raízes das espécies de plantas da família Solanaceae avaliadas neste estudo, onde esses aspectos não foram expressos em nenhuma das plântulas presentes nos tratamentos. Já Rickli e colaboradores (2011), ao avaliar o efeito do extrato aquoso de folhas frescas de Nim sobre a germinação de alface, soja, milho, feijão e picão preto, como forma de controle de

plantas invasoras, perceberam que o extrato interferiu no processo de germinação apenas de sementes de alface.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* representam estudos primordiais para entender os efeitos e os mecanismos de ação de novos compostos com ação nematotóxica. Essa etapa é de grande relevância e corresponde ao primeiro passo da investigação da citotoxicidade presente nos ECAs, sendo um dos primeiros passos para investigar a toxicidade de um material na área da saúde. Os ECAs obtidos no presente estudo apresentaram toxicidade irrelevante quando testados contra hemácias, exceto para o ECA da espécie 1, causando lise em torno de 80% das hemácias presentes. Os demais ECAs, espécies 2, 3, 4 e 5 não apresentaram toxicidade sobre as hemácias (ausência de lise). Característica marcante do ECA da espécie 1, em que os demais ECAs não apresentaram foi a presença de saponinas, em que no processo de extração e purificação da amostra observou-se grande presença de espuma. Segundo Peres (2010), as saponinas estão correlacionadas com o alto índice de toxicidade, o que pode ter causado o alto índice de lise observada nas hemácias, tornando-a mais tóxica que as demais espécies. Diversos autores como Fang-Dai (2006), Glauert (1962), Dewick (2002) e Karabaliiev (2003), relataram em seus trabalhos que as saponinas triterpênicas é um grupo de compostos naturais associados à citotoxicidade graças à sua capacidade de induzir hemólise, efeito esse resultante da interação desses compostos com os componentes da membrana celular de eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo deformação na membrana com consequente extravasamento do conteúdo intracelular. Estes resultados podem estar em concordância com o resultado obtido neste estudo, uma vez que a lise das hemácias ocorreu apenas para o ECA da espécie 1. Não descartando também a possibilidade de presença de distintas classes de metabólitos presentes nos demais ECAs, porém o que pode ter ocorrido pode estar relacionado a presença de classes mais distintas

presentes no ECA da referida espécie 1. Espécies de plantas da família Solanaceae podem apresentar variação na concentração de diversos metabólitos secundários, incluindo os alcaloides, que acarretam também a lise celular devido à elevada toxicidade apresentada, além das saponinas (Dewick, 2002; Fang-Dai *et al.*, 2006; Pequeno & Soto-Blanco, 2006). Segundo Bruneton (1999), as saponinas são amplamente encontradas em espécies de solanáceas selvagens e atuam na defesa contra o ataque de insetos, e patógenos como vírus, fungos e bactérias. Portanto, a ação antimicrobiana atribuída a várias plantas, muitas vezes, está relacionada à presença de tais compostos (Lacaille-Dubois & Wagner, 1996). Esses resultados confirmam os resultados obtidos, ao avaliar a citotoxicidade usando fibroblastos e hemácias. Segundo Lacaille-Dubois & Wagner (1996), as saponinas apresentam atividade hemolítica, corroborando com os resultados obtidos para o ECA da espécie 1.

A toxicidade foi avaliada também sobre células eucarióticas, fibroblastos, permanecendo em contato com os ECAs por dois períodos, 24 horas e 48 horas. Após as avaliações, observou-se que apenas o ECA da espécie 3 apresentou toxicidade mais baixa nos dois períodos de avaliação, os demais ECAs foram tóxicos, independentemente do tempo de exposição às amostras. Diferentemente dos resultados obtidos por Ombredane (2006), ao testar em ensaios *in vitro* o potencial citotóxico de extratos aquosos de *Curcuma longa* (açafrão) encapsulados em partículas de prata associados à quitosa sobre fibroblastos durante exposição 24 horas e 48 horas, verificou a não toxicidade sobre as células nos referidos tempos de avaliação. A toxicidade encontrada nos ECAs pode estar relacionada com a dose dependente analisada de cada espécie, ou a quantidade de compostos existentes em cada espécie, tornando-a mais tóxica que outras. Espécies de plantas da família Solanaceae podem apresentar variação na concentração dos diversos metabólitos secundários incluindo os alcaloides piridínicos, alcaloides tropânicos (Lee, 2007), e isso pode justificar o alto grau de lise celular apresentado especificamente para o ECA de raiz

da espécie 1, fato este característico de plantas selvagens, onde as mesmas apresentam elevados índices de graus de metabólitos que estão diretamente ligados à defesa (Peres, 2010). Fang-Daí (2006) e colaboradores obtiveram resultados semelhantes ao avaliar a toxicidade de flavonóis e glicosídeos sobre hemácias.

Levando em consideração a importância dos organismos benéficos presentes no solo e a especificidade dos extratos sobre os nematoides, bem como as normas estabelecidas dentro do MAPA e descritas na Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989, como sendo parte das exigências para produtos com fins fitossanitários à base orgânica, esses mesmos ECAs foram avaliados sobre bactérias benéficas fixadoras de nitrogênio utilizadas em commodities de grande importância econômica, como a soja, *Azospirillum brasiliense* (AbV5 e AbV6) e *Bradyrhizobium japonicum* e *B. diazoefficiens*. Dos cinco ECAs testados nenhum inibiu a multiplicação dessas espécies. Assim, destaca-se como um ponto positivo desses ECAs, a sua inocuidade a essas bactérias dotadas de importância como sendo reguladoras do crescimento em plantas cultiváveis e não cultiváveis presentes nos solos brasileiros.

Ainda levando em conta a crescente preocupação em manter a rizosfera com todos os organismos benéficos presentes, foram realizados os testes para avaliar se os cinco ECAs possuem ação sobre fungos filamentosos utilizados como agentes de controle biológicos (Caboni & Ntalli, 2012; Newman, 2003; Newman, 2016). Neste âmbito, os ECAs das cinco espécies de solanáceas foram testados sobre o crescimento micelial de *Trichoderma asperellum* e *T. harzianum*. Observou-se que apenas o ECA da espécie 1 inibiu em parte o crescimento micelial das duas espécies de *Trichoderma* avaliadas, os demais ECAs não interferiram no crescimento micelial das espécies de *Trichoderma*. Foi notado que, por mais que o ECA da espécie 1 inibiu em parte o crescimento micelial de ambas as espécies dos fungos, notou-se uma maior presença de esporulação conidial em ambas as espécies

dos fungos, bem como mudança brusca na coloração das colônias presentes. Para os demais ECAs, a coloração das espécies manteve idênticas às do controle negativo.

Devido a interferência apresentada no crescimento micelial das duas espécies de *Trichoderma* mantidas em contato com o ECA da espécie 1, foi então realizado teste de vigor da esporulação conidial presentes em ambas as amostras. O que pode ser constatado que, por mais que esse ECA da espécie 1 tenha causado um nível de toxicidez sobre o crescimento dos *Trichodermas*, esse mesmo ECA não foi capaz de reduzir o teor da esporulação conidial, tal resultado pode ser comparado com a esporulação dos controles negativos das mesmas espécies analisadas, onde não foi notado uma diferença entre os tratamentos e o controle negativo. Esse teste foi realizado devido a importância desses fungos no controle biológico de patógenos, como nematoides do gênero *Meloidogyne*, além da necessidade na utilização dos mesmos em culturas de grande importância econômica, visando o controle de diversos organismos patogênicos presentes no solo. Ressaltando que a intenção desta avaliação é encontrar nos ECAs características como especificidade, onde a ação desses ECAs seja apenas sobre organismos fitopatogênicos, e não sobre organismos benéficos. Portanto, foi avaliado o vigor da esporulação dos conídios presentes nas placas que apresentaram inibição do crescimento micelial. Os mesmos ECAs quando avaliados sobre fungos leveduriformes de solo, não apresentaram efeito tóxico sobre o crescimento em placa de Petri, onde verificou-se ausência de halo onde os ECAs foram dispensados na placa. Além de ação antifúngica, extratos de plantas da família Solanaceae apresentaram efeitos promissores sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, conforme ensaios *in vitro* realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não apresentados), onde a taxa de mortalidade dos juvenis foi acima de 77% para os ECAs das espécies 1, 2, 3, 4 e 5.

O ECA da espécie 1, após fracionamento por RP-HPLC possibilitou a identificação da fração majoritária com retenção em 22 minutos. A fração identificada foi cumarina, sendo identificada por UPLC-PDA/ UV (escopoletina). Ao avaliar a ação dessa molécula (escopoletina) sobre os juvenis de segundo estágio, verificou-se que essa molécula em uma concentração de $50\mu\text{g/ml}^{-1}$ não apresentou ação sobre os juvenis, onde 85% mantinham movimentando. Acredita-se que a ação dessa molécula sobre os juvenis possa estar associada a outra molécula. Neste sentido, as demais frações presentes nos eluatos 1 e 2 do ECA da espécie 5 necessitam ser identificadas, posteriormente serão testadas sobre os juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, caso nenhuma das frações presentes possuam ação nematicida sobre os J₂, testes de sinergismo serão realizados com ambas as moléculas identificadas para certificação da ação nematicida.

6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que os ECAs avaliados das cinco espécies de solanáceas, paralisaram 100% dos juvenis de segundo estágio de *M. incognita* (J₂) na concentração de 1 mg.ml^{-1} após 48 horas de exposição.

Os extratos aquosos de raízes das espécies 1, 2, 4 e 5 da família Solanaceae mantiveram efeito nematicida acima de 77% mesmo quando submetidos a temperatura de 50 °C. Apenas o ECA da espécie 3 perdeu a atividade nematicida após ser aquecido a 50 °C.

Os ECAs das espécies 1, 4 e 5 inibiu em média 99% a eclosão de juvenis de segundo estágio. Os mesmos ECAs apresentaram dose letal média DL₅₀ de $716\mu\text{g/ml}^{-1}$ (ECA espécie 1); aproximadamente $400\mu\text{g/ml}^{-1}$ (ECA espécie 4) e $336\mu\text{g/ml}^{-1}$ (ECA espécie 5).

Os ECAs das cinco espécies de solanáceas não apresentaram nenhum efeito fitotóxico sobre a germinação de sementes de soja, porém induziram o crescimento das plântulas em mais de 50% quando comparados com as plântulas do controle negativo.

Apenas o ECA da espécie 1 inibiu parcialmente o crescimento micelial de *Trichoderma asperellum* e *T. harzianum*. Apesar da inibição ocasionada pela adição do ECA da espécie 1, não foi observado alteração no processo de germinação dos conídios tão pouco na formação dos tubos germinativos, os quais apresentaram forma e tamanhos similares aos contidos no controle negativo. No entanto, para o controle negativo de *T. harzianum*, observou-se maior presença de conídios em início de germinação, diferentemente dos demais tratamentos, onde houve presença de tubos germinativos longos.

Os ECAs das cinco espécies de solanáceas não apresentaram toxicidade sobre bactérias fixadoras de nitrogênio e sobre levedura de solo.

Os ECAs das cinco espécies de solanáceas apresentaram baixa toxicidade sobre fibroblastos e, quando testados sobre hemácias suínas, apenas o ECA da espécie 1 apresentou alto índice de hemólise.

Os extratos das espécies 4 e 5 reduziram significamente o número de massas de ovos e de galhas em raízes de *Nicotiana tabacum* infectadas com *M. incognita* em casa de vegetação, após serem submetidos 48 horas a diferentes concentrações dos ECAs das espécies 4 e 5.

Os eluatos obtidos das espécies 1, 4 e 5 paralisaram 100% dos juvenis de segundo estágio de *M. incognita* (J₂) após 48 horas de exposição na concentração de (500µg/ml⁻¹).

Após o ensaio de recuperação dos eluatos, verificou-se que o primeiro e o segundo eluato da espécie 5 apresentou ação nematicida acima de 80% e o terceiro eluato apresentou ação de 50% sobre os juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.

A molécula identificada via UPLC/PDA, escopoletina (C₁₀H₈O₄), não apresentou efeito sobre os juvenis de segundo estágio de *M. incognita* na concentração 50µg/ml⁻¹.

Os resultados evidenciam a potencialidade de extratos aquosos e de moléculas advindo de raízes de plantas da família *Solanaceae* com propriedade nematicida sobre *M. incognita* vislumbrando novas perspectivas para o controle deste que é um dos patógenos mais problemáticos para agricultura brasileira e mundial.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho, com extratos aquosos de raízes de plantas da família *Solanaceae*, conduzem a busca por novas moléculas com atividade nematotóxica sobre *M. incognita*, assim como de outras espécies de fitonematoides que representam grandes desafios a serem superados na agricultura nas próximas décadas.

Dessa forma, os resultados obtidos, darão subsídios ao desenvolvimento de outras pesquisas que vislumbrem a descoberta de novas moléculas e produtos de origem vegetal, possuindo alta especificidade para o controle de fitonematoides que possam ser utilizados de forma sustentável em substituição a nematicidas sintéticos, que por sua vez são altamente tóxicos, tanto ao homem quanto ao meio ambiente, deste modo contribuindo para a substituição de nematicidas químicos sintéticos altamente tóxicos para a saúde humana/animal e ambiental, por nematicida orgânico. Esses por sua vez, podem contribuir para a manutenção do contínuo aumento da produtividade; na redução da contaminação dos solos, nascentes e lençóis freáticos, na manutenção do equilíbrio da biodiversidade e da quantidade de organismos não alvo necessários para a fertilidade do solo e na produção de alimentos mais seguros.

LITERATURA CITADA

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

ABAD,P.; GOUZY,J.; AURY,J.M.; CASTAGNONE-SERENO,P.; DANCHIN,E.G.J.; DELEURY,E.; PERFUS-BARBEOCH,L.; ANTHOUARD,V.; ARTIGUENAVE,F.; BLOCK,V.C. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology*, New York, 26(8):909-915, 2008.

ABAD,P.; CASTAGNONE-SERENO,P.; ROSSO,M.N.; ENGLER,J.A.; FAVERY,B. Invasion, feeding and development. In: PERRY,R.N.; MOENS,M.; STARR,J.L. *Root-knot Nematodes*. Cambridge, MA,163-181, 2009.

ABDEL-DAYEM,E.A.; ERRIQUENS,F.; VERRASTRO,V.; SASANELLI,N., MONDELLI,D.; COCOZZA,C. Nematicidal and fertilizing effects of chicken manure, fresh and composted olive mill wastes on organic melon. *Helminthologia*, 49:259-269, 2012.

ABDEL-RAHMAN,F.H.; ALANIZ,N.M.; SALEH,M.A. Nematicidal activity of terpenoids, 48(1):16-22, 2013.

ADEGBITE,A.A. Effects of some indigenous plant extracts as inhibitors of egg hatch in root-knot nematode (*Meloydogine incognita* race 2), *American Journal of Experimental Agriculture*, 1(3):96-100, 2011.

AGRIOS,G.N. *Plant Pathology*, Department of Plant Pathology, University of Florida. 5 Ed.,2005.

ALBERGONI,L; PELAEZ,V. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas. *Revista de Economia*, Curitiba, 33(1):39, 2000.

ALMEIDA,C.D.S.; SPUZA,D. dos S.de L.; DEL SARTO,R.P.; FIRMINO,A.A.P.; SILVA, T.S.; MAGALHÃES,J.C.C.; GROSSI de SÁ,M.F.; ROCHA,T.L. Fracionamento de extrato aquoso de sementes de *Crotalaria spectabilis* efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Circular Técnica*, 2008.

AMARAL,D.R.; OLIVEIRA,D.F.; CAMPOS,V.P.; CARVALHO,D.A. Efeitos de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Nematologia Brasileira*, 26(1):43-48, 2002.

BAKHETIA,M.; CHARLTON,W.; ATKISON,H.J.; MCPHERSON,M.J. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 18(10):1099-1106, 2005.

BALDIN,E.L.L.; WILKEN,S.R.S.; PANNUTI,L.E.R.; SCHLICK-SOUZA,E.C.; VANZEI,F.P. Uso de extratos vegetais, manipueira e nematicida no ocntrole de nematoide das galhas em cenoura. Summa Phyopathologica,38(1): 36-41, 2012.

BARKER,K.R. Introduction and synopsis of advancements in nematology. In: BARKER, K.R.; PEDERSON,G.A.; WINDHAM,G.L. Plant and nematode interactions. Madison: American Society of Agronom, 1-20, 1998.

BHATT-MEHUL,K; DHOLWANI KISHOR,K.; SALUJA AJAY,K. Isolation and structureelucidation of Scopoletin from *Ipomoea reniformis (Convolvulaceae)*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 01(05):138-144, 2011.

BERNY,P. Pesticides and the intoxication of wild animals. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 30(2):93-100, 2007.

BONETI,J.I.S.; FERRAZ,S. Modificação do método de Hussey & Baker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6(553), 1981.

BORGES,F.G.; BATISTTUS,A.G.; MULLER,M.A.; MIORANZA,T.M.; KUHN,O.J. Manejo alternativo de nematoides de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Scientia Agraria Paranaensis, 12:425-433, 2013.

BRUNETON,J. Triterpenes and steroids. In: BRUNETON,J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Londres, 2: 661-719, 1999.

CABONI,P.; SABA,M.; OPLOS,C.; AISSANI,N.; MAXIA,A.; MENKISSOGLU SPIROUDI; NTALI,N.G.. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. Pest Management Science, 2014.

CABRAL,C.; PITA,J.R.; SALGUEIRAO,L. Plantas medicinais: entre o passado e o presente, Faculdade de Farmácia, Coimbra, 2015.

CANTRELL,C.L.; SCHARDER,K.K.; MAMONOV,L.K.; SITPALVA,G.T.; KUSTOVA,T.S.; DUNBAR,C.; WEDGE,D.E. Isolation and identification of antifungal and antialgal alkaloids from *Haplophyllum sieversii*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington,53:7741, 2005.

CANTRELL,C.L.; DAYAN,F.E.; DUKE,S.O. Natural products as sources for new pesticides. Journal of Natural Products,75(6):1231-1242, 2012.

CARES,E.; BLUM,E.B.; EDNALVA,P.A. Nematologia vegetal: uma introdução. In: BLUM,L.E.; CARES,J.R.; UESUGI,C.H (Ed). Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas. Cap. 11, 1 ed., Brasília: Otimismo, 2006.

CASTRO,A.G. Defensivos agrícolas como um fator ecológico. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPDA,pp.20, 1989.

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

COGO,F.D.; CORREA,A.; FERNANDES,L.G.; CARVALHO,H.P.; CAMPOS,K.A. Eficiência de extratos vegetais no controle de Cercosporiose em mudas de cafeeiro. Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária, Paraíba, 5(1):31-34, 2011

COIMBRA,J.L. *et al.* Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41(7):1209-1211, 2006.

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

COOLEN,W.A.; D'HERDE,C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agriculture Research Center – GHENT, Belgium,77, 1972.

CORABI-ADELL,C.; LUCON,C.M.M.; KOIKE,C.M. Biodiversidade do gênero Trichoderma no estado de São Paulo, aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, 69:188-191, 2002.

CORADIN,L.; SIMINSKI,A.; REIS,A. Espécies nativas da flora Brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro, Região Sul. Brasília, MMA, 2011.

CORRÊA,J.C.R.; SALGADO,H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu,4(13):500-506, 2011.

CORRÊA,J.A.M. Estudo químico de extratos de plantas da Família Solanaceae com atividade a fungos fitopatogênicos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Piracicaba, 2015.

CHAIM,A. O passado e o presente da tecnologia de aplicação de agrotóxicos. *in.* Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental, 8:290-293, 1999.

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

CHEN,Y.; DAI,G. Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum daganarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. Journal of the Science of Food and Agriculture, London,92:1937- 1943, 2012.

CHITWOOD,D.J. Phytochemical based strategies for nematode control 1. Annual review of Phytopathology, 40(1):221-249, 2002.

CLARDY,J.; WALSH,C. Lessons from natural molecules. Nature, 432(7019):829-837, 2004.

CROTEAU,R.; KUTCHAN,T.M.; LEWIS,N.G. Natural products (Secondary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, in: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, American Society of Plant Physiologists, 1250-1311, 2000.

DAMALAS,C.A.; ELEFTHEROHORINOS,I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. Int J Env Res Public Health, (8):1402-19, 2011.

D'Arcy,W.G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution. Eds. Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M. and Estrada, N. 75-137. London: Kew Royal Botanical Gardens, 1991.

Decreto N° 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos>.

Decreto N° 6.913, de 23 julho de 2009. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/dcreto-no-06-913-de-23-de-julho-de-2009.pdf/view>.

De LEY,P.; Blaxter,M.L., Systematic position and phylogeny, in The Biology of Nematodes, D. Lee, Taylor & Francis: London,1-30, 2002.

DEWICK,P.M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. John Wiley & Sons, 291-300, 2002.

DIAS,C.R.; SCHWAN,A.V.; EZEQUIEL,D.P.; SARMENTO,M.C.; FERRAZ,S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Nematologia brasileira, 24(2):203-210, 2000.

DIAZ,G.J. Toxicosis by plant alkaloids in humans and animals in Colombia. *Toxins*,7:5408-5416, 2015.

DINARDO-MIRANDA,L.L.; FRACASSO,J.V. Efeito de mamona sobre populações de nematoides fitoparasitos e a produtividade da cana-de-açúcar. Instituto Agronômico, Centro de cana-de-açúcar, Ribeirão Preto, 34(1):68-71, 2010.

DIXON,R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(83):843-847, 2001.

DUFOUR,R.; GUERRERA,M.; EARLES,R. Appropriate Technology Transfer for Rural Areas. *Alternative Nematode Control*, 2003.

EICH,E. Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

ELBADRI,G.A.; LEE,D.W.; PARK,J.C.; YU,H.B.; CHOO,H.Y. Evaluation of various plant extracts for their nematocidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11(2):99-102, 2008.

ESCOBAR,C.; BARCALA,M.; CABRERA,J.; FENOLL,C. Overview of root-knot nematodes and giant cells. In: *Advances in botanical research: Elsevier*, (73):1-32, 2015.
FAO. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome: 2017.

FANG-DAI, QUING MIAO; BO ZHOU; LI YANG; ZHONG-LI-LIU. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Elsevier, life Sciences*, 78:2488-2493, 2006.

FERRAZ,L.C.C.B.; BROWN,D.J.F. *Nematologia de Plantas: fundamentos e importância*. Ed.Norma, Manaus, pp.251, 2016.

FEENY, P. Plant apparency and chemical defence. *Recent Adv. Phytochem*.10:1-40, 1976.

FERRAZ,S.; FREITAS,L.G. O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais. *Sociedade Brasileira de Nematologia*, 2000.

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

FERRAZ,S.; FREITAS,L.G. O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais. *Departamento de Fitopatologia, UFV*,1-17, 2008.

FERRAZ,L.C.C.B.; MONTEIRO,A.R. Nematoides. In: Bergamim Filho A, Kimati H, Amorim L. *Manual de Fitopatologia*, 1, 1995.

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

FERRAZ,S.; FREITAS,L.G.; LOPES,E.A.; DIAS-ARIEIRA,C.R. Manejo sustentável de fitonematoíodes. Viçosa: UFV,p245, 2010.

FERREIRA,P.A.; FERRAZ,S.; LOPES,E.A.; FREITAS,L.G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo de compatibilidade entre isolados fúngicos. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, Viçosa, 2(3):15, 2008.

FERREIRA,M.L.P.C. A pulverização aérea de agrotóxicos no Brasil: cenário atual e desafios. São Paulo, 15:18-45, 2015.

FERREIRA,M.J.M.; VIANA, M.M.J. A expansão do agronegócio no semi-árido cearense e suas implicações para a saúde, o trabalho e o ambiente. Interface – Comunicação, Saúde, Educação, 20(58):649-660, 2016.

FERRIS,H.; ZHENG,L. Plants of Chinese herbal remedies: effects on *Prathylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica* of Nematology, 31(3):241-263, 1999.

FREITAS,L.G.; MARRA,B.M.; NEVES,W.S.; DIAS,C.R. Controle de *Meloidogyne javanica* com aplicação de óleo essencial de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) e mostarda (*Brassica campestris*). Fitopatologia Brasileira, 25:336, 2000.

FREITAS,L.G. *et al.* Introdução à Nematologia. 3ª ed. Viçosa, 83, 2006.

GAOFU,Q.; SHIQUING,M.; FAYIN,Z.; ZHINIYU,Y.; XIUYUN,Z. *In vitro* assessment of plant lectins with anti-pinewood nematode activity. Journal of Invertebrate Pathology, 98:40-45, 2008.

GARDIANO,C.G. *et al.* Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. Arquivos do Instituto Biológico, 78(4):553-556, 2011.

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

GLAUERT,A.M.; DINGLE,J.T.; LUCY,J.A. Action of saponin on biological cell membranes. Nature, 196:952-955, 1962.

GENTZ,M.C.; MURDOCH,G.; KING,G.F. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biological Control*, 5:208-215, 2010.

GOMES,J. Histórico do controle biológico no Brasil. *Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas*, Rio de Janeiro, 21:89-97, 1962.

GOMMERS,F.J. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. *Helminthological Abstracts: Plant Nematology*, 50(1):9-24, 1981.

GONÇALVES,A.P.P.; VIEIRA,G.D.; CUNHA,P.N.A.; KISSLER,T.V.; HERNÁNDEZ,A.E.F.; TELES,C.B.G. Caracterização fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos de *Solanum subinerme* (Solanaceae). *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*, 18(2):8-16, 2016.

GOWEN,S.R. Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects. *Plant nematode problems and their control in the Near East region*, 2017.

GRIFFIN,J.W; LIN,G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, London 53: 623-637, 2000.

HALFED-VIEIRA,B.A.; MARINHO-PRADO,J.S.; NECHET,N.L.; MORANDI,M.A.B.; BETTIOL,W. *Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas*, Brasilia- DF, 2016.

HALL,R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*,169(3):453-468, 2006.

HARBORNE,J.B; BAXTER,H. *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from Plants*. London: Taylor & Francis, p.791, 1993.

HASEEB,A.; BUTOOL,F. Evaluation of nematicidal properties of some members of the family Solanaceae. *Elsevier, Bioresource Technology*, 57: 95-97, 1996.

HASSINE,T.; MANSOUR,A.; HAMMAMI,S. Case report of fatal poisoning by *Nicotiana tabacum* in cattle in Tunisia. *Rev. Med. Vet.* 164, 141-144, 2013.

HAYDOCK,P.P.J.; WOODS,S.R.; GROVE,I.G.; HARE,M.C. Chemical control of nematodes. In: Perry,R.N.; Moens, M (eds) *Plant nematology* . CAB International, 392-410, 2006.

HAWKES,J.G. The economic importance of the family Solanaceae. *Solanaceae IV. Advances in Biology & Utilization*, Londres, 1999.

- HEGNAUER,R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhauser Verlag, Basel,9: 786, 1990.
- HONÓRIO JÚNIOR,J.E.R.,*et al.* Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. Revisão, Rev. Bras. Farmacognosia, 20(3),2010.
- HOWELL,C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, St. Paul, 87(1):4-10, 2003.
- HUSSEY,R.S.; BARKER,K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique”. Plant Disease Reporter, 57(12):1025-1028, 1973.
- HUNZIKER,A.T. The genera of Solanaceae. Ruggel, Lichtenstein: A.R.G. Gantner Verlag, 2001.
- INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA SDA/SDC/ANVISA/IBAMA. Nº 2, DE 12 DE JULHO DE 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/produtos-fitossanitarios/arquivos-especificacao-de-referencia/in-conjunta-sda-sdc-no-2-de-12-de-julho-de-2013.pdf>
- ISMAN,M.B. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19:603-8, 2000.
- JACOBS,P. Nematophagous fungi: Guide Philip Jacobs, BRIC version 2002.
- JANG,J.Y.; LE DANG,Q.; CHOI,Y.H.; CHOI,G.J.; JANG,K.S.; CHA,B.; LUU,N.H.; KIM,J.C. Nematicidal activities of 4-quinolone alkaloids isolated from the aerial part of *Triumfetta grandidens* against *Meloidogyne incognita*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63: 68-74, 2015.
- JAVED,N.; GOWEN,S.R.; INAM-UL-HAQ,M.; ABDULLAH,K.; SHAHINA,F. Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. Crop Protection, Guildford, 26: 911-916, 2006.
- JENKINS,W. A rapid centrifugal-flotation technique for sep-arating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48, 9. KAR,S.; KAR,K.; BHATTACHARYA,P.K.; GHOSH,D. K. 1993. Exper, 1964.
- JONES,J.T.; HAEGEMAN,A.; DANCHIN,E.G.J.; GAUR,H.S.; HELDER,J.; JONES,M. G.K.; KIKUCHI,T.; MANZANILLA-LOPEZ,R.; PALOMARES-RIUS,J.E.;

WESEMAEL,W.M.L.; PERRY, R.N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14: 946–61, 2013.

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

KARABALIEV,M.; KOCHEV,V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sensors and Actuators*, 88:101-105, 2003.

KARSSSEN,G.; MOENS,M. Root-knot nematodes. In: Perry,R.L., Moens,M. eds. *Plant Nematology*, Cambridge, 59-90. 2006.

KHAN,Z.; KIM,Y.H. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. *Appl. Soil Ecol.*, 35(2):370-379, 2007.

KHAN,Z.; KIM,Y.H.; KIM,S.G.; KIM,H.W. Observations on the suppression of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) on tomato by incorporation of cyanobacterial powder (*Oscillatoria chlorina*) into potting field soil. *Bioresource Technol.*, 98(1):69-73, 2007.

KHAN,A.; ASIF,M.; TARIQ,M.; REHMAN,B.; PARIHAR,K.; SIDDIQUI, M.A. Reserch article: Phytochemical investigation, nematostatic and nematicidal potential of weeds extract against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita in vitro*. *Asian J. Biol. Sci.*, 10(2): 38-46, 2017.

KHURMA,U.R.; SINGH,A. 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, 1997.

KORAYEM ,A.M.; HASABO,S.A.; AMEEN,H.H. Effects and mode action of some plant extracts on certain plant parasitic nematodes. *Anzeiger fur Schadlingskunde*, 66(2): 32-36, 1993.

LACAILLE-DUBOIS,M.A.; WAGNER.H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2:363-386, 1996.

LEE,M.R. Solanaceae IV: *Atropa belladonna*, Deadly nightshade. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 37: 77-84, 2007.

Lei n. 7.802 de 11 de julho 1989. Disponível em <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/616627.pdf>>.

- LEWIS, J.A.; PAPAVIDAS, G.C. Effect of sulfur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces euteiches*. *Phytopatology*, 61:208-214, 1971.
- LI, N., *et al.* Induction of apoptosis on human breast Cancer Bcap-37 cells through mitochondria-mediated pathway. *Chinese Herbal Medicines*, 8(2): 164-172, 2016.
- 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. Isolation of nematocidal triterpenoid saponins from *Pulsatilla koreana* root and their activities against *Meloidogyne incognita*. *Molecules*, 8-18(5): 5306-16, 2013.
- LIMA, A.F. Potencial e investigações químicas de Solanaceae em relação a *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação de Mestrado, São Paulo, 2017.
- LONGHI, J.G. Atividade biológica da semente de *Mucuna pruriensis*. Dissertação de Mestrado, Curitiba-PR, 2007.
- LOPES, E.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; VIEIRA, B.S. Nematoides das galhas. The Plant Health Instructor, 2011.
- LORDELLO, L.G.E. Métodos gerais de controle. Lordello, L.G.E (ed.) Nematoides das Plantas Cultivadas. São Paulo: Nobel, 81-123, 1984.
- MAISTRELLO, L.; VACCARI, G; SASANELLI, N.. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Helminthologia* 1: 48-57, 2010.
- MANI, A.; CHITRA, K.C. Toxicity of certain plant extracts to *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* 17: 43-44, 1989.
- MANYAM, B.V.; DHANASEKARAN, M.; HARE, T.A. Neuroprotective effects of the antiparkinson drug *Mucuna prurienseis*. *Phytotherapy Research*, 18:706-712, 2004.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/revisao-da-legislacao-brasileira-de-agrotoxicos>>.
- MDEE, L.K.; MASOKO, P.; ELOFF, .N. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. *South African Journal of Botany*, Pretória, 75:375-379, 2009.
- MARIYONO, J. Direct and indirect impacts of integrated pest management on pesticide use: a case of rice agriculture in Java, Indonesia. *Pest Management Science*, 64(10):1069-1073, 2008.

- MARQUES,L.C. Preparação de extratos vegetais. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, 3(2):74-76, 2005.
- MARTINS,M.C.B.; SANTOS,C.D.G. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. *Revista Ciência Agronômica*, 47(1):135-142, 2016.
- MASHELA,P.W.; NTHANGENI,M.E. Efficacy of *Ricinus communis* fruit meal with and without *Bacillus* species on suppression of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Phytopathology*, St.Paul, 150: 399-402, 2002.
- MAYTON,H.S.; CLAUDIA,O.; VAUGHN,S.F.; LORA,R. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isotiocianato production in macerated leaf tissue. *Phytopathology*, 86:267-271, 1996.
- MELLO,A.F.S.; MACHADO,A.C.Z.; INOMOTO,M.M. Potencial de controle da erva-de-santa-maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. *Fitopatologia Brasileira*, 31:513-516, 2006.
- MENEZES,E.L.A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. *Seropédica*, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 58p , 2005.
- MIAN,I.M.; RODRIGUEZ,R. Survey of nematicidal properties of some organic materials available in Alabama as amendment to soil for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica*, 12(2): 235-246, 1982.
- MILLADERT,A. Notes sur lês vignes Américaines et opuscules divers. Bordeaux, Chez Feret & Fils, 1881.
- MORS,W.B.; Rizzini,C.T; PEREIRA,N.A. Medicinal plants of Brazil 2000: Reference Publications, 2000.
- MOURA,R.M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidogynose. Parte I, Revisão anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, 4:209-244, 1997.
- MOURA,R.M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte III - resenha histórica. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, 13/14:93-144, 2017.
- MURASHIGIE,T.; SKOOG,F. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tiddu cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 1962.
- MURUGESAN,N.; MURUGESH.T. Efficacy of some plant products against spotted Leaf beetle (*Hadda beetle*), *Henosepilachna vigintioctopunctata* (F.) in Brinjal. *Journal of Biopesticides*,1(1):67-9, 2008.

NANDAKUMAR,A.; VAGANAN,M.M.; SUNDARARAJU,P; UDAYAKUMAR,R. Nematicidal activity of aqueous leaf extracts of *Datura metel*, *Datura inoxia* and *Brugmansia suaveolens*. American Journal of Entomology,1(2):3945, 2017.

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

NAZ,I.; PALOMARES-RIUS,J.E.; SAIFULLAH,V.B.; KHAN,M.R.; ALI,S.; ALI,S. *In vitro* and *in planta* nematicidal activity of *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) against the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Pathology 62: 943- 952, 2012.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory. Standards Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—Eighth. NCCLS document M2- A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.

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

NEWMAN,D.J.; CRAGG,G.M; Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products, 79(3):629-61, 2016.

NOLING,J.W.; GILREATH,J.P. Weed and nematode management: Simultaneous considerations. Annu. Int. Res. Conf. on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, MBAO, 2002.

NTALLI,N.G; CABONI,P. Botanical nematicides: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60:9929-9940, 2012.

OLIVEIRA,J.A. Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). Dissertação Mestrado em Fitossanidade – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 111 f., 1991.

OLIVEIRA,S.C.C. Estudo alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal. Tese Doutorado , Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, pp.163, 2009.

OMBREDANE,A.S. 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, Brasília, 2016.

OSEI,K.; GOWEN,S.R.; PEMBROKE,B.; BRANDENBURG,R.L.; JORDAN,D.L. Potential of leguminous cover crops in management of a mixed population of root-knorr

nematodes (*Meloidogyne* spp.). Journal of Nematology, The Society of Nematology, 42(3):173-178, 2010.

OSLEN,M.W. Root-knot nematode. College of Agriculture and life Sciences, 2000.

PANDEY.R. Performance of oil seed cake, pesticides and dry leaf matter on the reproduction protection of *Meloidogyne incognita* and yield for Japanese mint HY-77. National symposium on nematode management with eco-friendly approaches and bio componets, 1995.

PARK,C.B.; LEE,J.H; PARK,I.Y.; KIM,M.S.; KIM,S.C. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. FEBS Letters, 411(2-3):173-178, 1997.

PARK,Y.; PARK,S.N; PARK,S.C.; PARK,J.Y.; PARK,Y.H.; HAHM,J.S.; HAHM,K.S. Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones. Biochemical and Biophysical Research, 2004.

PEQUENO,N.F.; SOTO-BLANCO,B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. Acta Scientia e Veterinariae, 34(1):45-48, 2006.

PEREIRA,I.S.P.; RODRIGUES,V.F.; VEGAS,M.R.G. Flavonoides do gênero Solanum. Rev. Virtual de Química, 8(1):4-26, 2016.

PEREIRA,J.C. Potencial alelopático e estudo fitoquímico dos extratos aquosos e etanólicos de *Canavalia ensiformis* (L.) DC e *Paspalum maritimum* Trind. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Alagoas, pp.146, 2017.

PERES,F.; MOREIRA,J.C.; DUBOIS,G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. Fiocruz, 21-41, 2007.

PERES,L.E.P. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 1-10, 2010.

PERRY,R.N.; MOENS,M.; STARR,J.L. Root-knot nematodes. In Eisenback. JD & Hunt DJ, eds. General morphology. Virgínia, 2009.

PERRY,R.N.; MOENS,M. Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. In: (Ed.). Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions: Springer, 3-20, 2011.

PIMENTEL,D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. Journal of Agricultural and Environmental Ethics, Dordrecht, 8:17-29, 1995.

PINHEIRO,J.B.; MENDONÇA,J.L.DE M.; RODRIGUES,C.DA S.; PEREIRA,R.B.; SUINAGA,F.A. Reação de *Solanum scuticum* a *M. enterolobii*. Brasília: Embrapa Hortaliças - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 106), 2014.

PINTO,A.C.; SILVA,D.H.S.; BOLZANI,V.S.; LOPES,N.P.E.R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, 25:45-61, 2002.

PINTO,F.C.L.; UCHOA,D.E.A.; SILVEIRA,U.E.R.; PESSOA,O.D.; BRAZ-FILHO,R. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. Quim. Nova,34(2):284-288, 2010.

POIROT,R.; PRAT,L.; GOURDON,G.; DIARD,C.; AUTRET,J.M. Fast batch to continuous solid-liquid extraction from plants in continuous industrial extractor. Chemical & Engineering Technology, 29(1):46-51, 2006.

PHILLIPS,P.J.; BODE,R.W. Pesticides in surface water runoff in south eastern New York State, USA: Seasonal and stormflow effects on concentrations. Pest Management Science, 60(6):531-543, 2004.

PRAKASH,A.; RHAO,J. Botanical pesticides in agriculture. Section B: Botanical pesticides against nematodes, p.632, 1948.

PRETTY,J.; GUIJT,I; SCOONES,I; THOMPSON,J. Regenerating Agroecology of low-external input and community-based development. In: KIRKBY, John; O'KEEFE, Phil; TIMBERLAKE, Lloyd (Eds.). The earthscan reader in sustainable development. UK.. p. 132, 1999.

QAMAR,F.; KAPADIA,Z.; KHAN,S.A.; BADAR,Y. *Datura metel* L. a plant with nematicidal potential. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 38(8):319-321, 1995.

QUARLES,W. Botanical pesticides from *Chenopodium?* The IPM Practitioner, 14(2): 1-11, 1992.

RAHMAN,A.U.; BHATI,M.K.; CHOUDHARY,M.L.; SENSER,B. Chemical constituents of *Fumaria indica*. Fitoterapia 63:129-35,1992.

RAO,M.S.; REDDY,P.P. Studies on the comparative efficacy of certain plant leaves and carbofuran in the management of *Meloidogyne incognita* on tomato. Current Nematology, 3(1):5-6, 1992.

RENAULT,S.; DELUCCA,A.J.; BORE,S.; BLAND,J.M.; VIGO,C.B.; SELITREMIKOFF,C.P. CAY-1, a novel antifungal compound from cayenne pepper. *Med. MYcol.*,41:75, 2003.

REZENDE,F.M.; ROSADO,D.; MOREIRA,F.A.; CARVALHO,W.R. In Furlan, C.M.*et al.* VI Botanica no inverno, São Paulo, pp.223, 2016.

RIBAS,P.P.; MATSUMURA,A.T.S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e o meio ambiente. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, 10(14): 149-158, 2009.

RISHER,J. F.; MINK,F.L.; STARA,J.F. The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review . *Environ Health Perspect*, 72(267):281, 1987.

RITZINGER,C.H.S.P.; FANCELLI,M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. *Jaboticabal*, 28(2):331-338, 2006.

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. Efeito nematocida de extratos aquosos de sementes de plantas sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* - Comunicado técnico 144, 2006.

ROCHA,T.L.; EVARISTO,R.G.S.; GROSSI-DE-SÁ,M.F.; LIMAe SOUZA,D.S.; SILVA,C.M.; POLEZ,V.L.P.; ROESNER,U.; BACIC,T. Nematotoxic composition of synergistic effect, use a nematotoxic composition of synergistic effect. United States Patent and Trademark Office – USA, número patente: US009750247B2, 2017.

ROCHA,T.L.; SOLL,C.B.; BOUGH,B.A.; SILVA,T.S.; OLDACH,K.; FIRMINO,A.A. P.; CALLAHAN,D.L.; SHEEDY,J.; SILVEIRA,E.R.; CARNEIRO,R.M.D.G.; SILVA, L.P.; POLEZ,V.L.P.; PELEGRINI,P.B.; BACIC,A.; GROSSI-DE-SA, M.F.; ROESSNER, U. 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, 2017.

RODDICK,J.G. The Importance of the Solanaceae in Medicine and Drug Therapy. In: *Solanaceae III: Taxonomy Garden, Chemistry, Evolution*. Eds. Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M. & Estrada, N. 7-23. London: Kew: Royal Botanic, 1991.

RODRIGES-KABANA,R.; KLOEPPER,J.W.; WEAVER,C.F.; ROBERTSON,D.G. Control of plant parasitic nematodes with furfural-a naturally occurring fumigant. *Nematropica*, 23:63–73, 1993.

SAHEBANI,N.; HADAVI,N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 40(8):2016-2020, 2008.

SALGADO,S.M.L.; CAMPOS,V.P. Ecloração e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. *Fitopatologia Brasileira*, 28:166-170, 2003.

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

SANTOS,M.F. *et al.* *Meloidogyne incognita* parasitizing coffee plants in southern Minas Gerais, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 43(1): 95-98, 2018.

SATISH,S. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *Journal of Agricultural Technology*, Tehran,3:09-119, 2007.

SARID,I.P.; LISNAWITA; OEMRY.; SAFNI,I.; LUBIS,K.; TANTAWI,A.R. Use of organic waste as biofumigante for controlling root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on potato. *IOP conf. Series: Earth and Environmental Science*, 122, 2018.

SCALBERT,A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.*, 30: 3875-3883, 1991.

SCHNEIDER,S.M.; ROSSKOKF,E.N.; LEESCH,J.G.; CHELLEMI,D.O.; BULL,C.T.; MAZZOLA,M. Agricultural research service research on alternatives to methyl bromide: pre-plant and post-harvest . United States Department of Agriculture - Pest Manag Sci, 59:814-826, 2003.

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

SLUTSKY,M.; LEVIN,J.L.; LEVY,B.S. Azoospermia and oligospermia among a large cohort of DBCP applicators in 12 countries. *Int J. Occup. Environ Health*, 5:116-122, 1999.

SEIBER,J.N.; COATS,J.; DUKE,S.O.; GROSS,A.D. Biopesticides: State of the art and future opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(48):11613-11619, 2014.

SEIGLER,D.S. Plant secondary metabolism. Review, *New Phytology*, 147:483-485, 2000.

SILANIKOVE,N.; PEREVOLOTYSKY,.; APROVENZA,F.D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Anim Feed Sci Technol*,91: 69-01, 2001.

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

SILVA,D.M.H.; BASTOS,C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. Fitopatologia Brasileira, 32:43-145, 2007.

SILVA,T.M; CAMARA,C.A; FREIRE, K.R.L.; SILVA, T.C.; AGRA, M.de F.; BHATTACHARYYA,J. Steroidal glycoalkaloids and molluscicidal activity of *Solanum asperum* Rich. Fruits. J. Braz. Chem. Soc., 19(5):1048-1052, 2008.

SILVA,M.L.C.; COSTA,R.S.; SANTANA,A.S.; KOBLITZ,M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 31(3):669-682, 2010.

SILVA,C.P.; RICCI,T.G.; ARRUDA,A.L.; PAGLIOSA,F.M.; MACEDO,M.L.R.; Bioherbicida e Bioinseticida. Uniciências, 21(1):25-34, 2017.

SIKORA,R.A.; FERNANDEZ,E. Nematodes parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. (Ed.). Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd ed. Wallingford: CABI International, 319-392, 2005.

SOARES,P.L.M. Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. São Paulo, 2006.

STEHMANN,J.R.; MENTZ,L.A.; AGRA,M.F.; VIGNOLI-SILVA,M.; GIACOMIN,L.; RODRIGUES,I.M.C. Solanaceae lista de espécies da flora do Brasil, 2015.

STIRLING,G.R. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects. Wallingford: CAB International, pp.281,1991.

SZEWCZYK,J.; DIBOWSKI,M.P.; DAWIDOWICZ,A.L. Application of SPE for selective fractionation of essential oils constituents from plant materials. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin, 70(2), 2015.

TAKASUGI,M.; YACHIDA,Y.; ANETAI,M.; MASAMUNE,T.; KEGASAWA,K. Identification os asparagusic acid as nematocide occurring naturally in the root of *Asparagus*. Chemical letters, 43-44, 1975.

TAYZ,L.; ZEIGER,E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

THAKAR,N.A. , PATEL,H.R.; PATEL,C.C. *Azolla* in management of root-knot disease in okra. Indian J. Nematol.,17 (1): 136-137, 1987.

THAKER,N.A. Effect of extracts of *Azolla pinnata* on egg hatching of root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. Madras Agric. J. 75: 297-299, 1988.

TIKU,A.R. Antimicrobial compounds and their role in plant defense. In: (Ed.). Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction: Springerp., 283-307, 2018.

THODEN,T.C; HALLMANN,J.; BOPPRÉ,M. Effects of plants containing pyrrolizidine alkaloids on the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. Eur. J. Plant. Pathol., 123:27-36, 2009.

TRUDGILL,D.L; BLOK,V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annu Rev Phytopathol, 39:53-77, 2001.

VAZ,F.M.G.B. Reação hospedeira de cultivares de porta-enxerto de tomateiro ao nemátode das galhas radiculares *Meloidogyne incognita*, 2018.

VEIGGI,P.C. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. Dissertação de Mestrado, Campinas - SP, 2009.

VIEIRA,P.C.; MAFEZOLI,J.; BAVATTI,M.W. Inseticidas de origem vegetal. In: Produtos naturais no controle de insetos. FERREIRA, J.T.B, CORRÊA,A.G, VIEIRA,P. C. São Carlos, 2001.

RICKLI,H.C.; FORTES,A.M.T.; da SILDA,P.S.S; PILATTI,D.M.; HUTT,D.R. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, milho, feijão e picão-preto. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 32(2):473-484, 2011.

ZUCKERMAN,B.M.; ESNARD,J. Biological control of plant nematodes-current status and hypothesis. Jpn. J. Nematol, 24:1-13, 1994.

WIRATNO,D.; TANIWIRYONOC,H.; VAN DER BERG,J.A.G.; RIKSEND,I.M.C.M.; RIETJENSB,S.R.; DJIWANTIA,J.E.; KAMMENGAD; MURK,A.J. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, The Open Natural Products Journal, 2099(2):77-85, 2009.

WILLIAMSON,V.M.; KUMAR,A. Nematode resistance in plants: The battle underground. Trends Genet., 22(7):396-403, 2006.

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