



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE AGRONOMIA

**AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES À BASE DE NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA E *BEADS* DE ALGINATO CONTENDO EXTRATOS
DE COGUMELOS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*.**

Ana Flávia Oliveira Rodrigues

BRASÍLIA-DF

2021

ANA FLÁVIA OLIVEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES À BASE DE NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA E *BEADS* DE ALGINATO CONTENDO EXTRATOS
DE COGUMELOS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*.**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Prof^ª. PhD. ANA MARIA RESENDE JUNQUEIRA

Co-orientadora: PhD. VERA LÚCIA PERUSSI POLEZ

BRASÍLIA-DF

2021

RODRIGUES, Ana Flávia Oliveira

Avaliação de formulações a base de nanopartícula de quitosana e *beads* de alginato contendo extratos de cogumelos no controle de *Meloidogyne incognita*, orientação de Ana Maria Resende Junqueira, co-orientação de Vera Lúcia Perussi Polez – Brasília, 2021. 46 p.

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021.

1. *Meloidogyne incognita* 2. Agricultura 3. Nematicida Natural 4. Biodefensivo

I. Junqueira, A. M. R. II. Ph.D.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: Ana Flávia Oliveira Rodrigues

Título: Avaliação de formulações a base de nanopartícula de quitosana e *beads* de alginato contendo extratos de cogumelos no controle de *Meloidogyne incognita*.

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desse relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva - se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte dessa monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

Ana Flávia Oliveira Rodrigues E-mail: nafla.ana@hotmail.com

ANA FLÁVIA OLIVEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES À BASE DE NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA E *BEADS* DE ALGINATO CONTENDO EXTRATOS
DE COGUMELOS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Ana Maria Resende Junqueira, Ph.D
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília
(Orientadora)

Prof^a. Nara Oliveira Silva Souza, Dra.
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília
(Examinadora)

Prof. Jean Kleber de Abreu Mattos, Dr.
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília
(Examinador)

BRASÍLIA-DF

2021

*Dedico este trabalho a Deus, a dra. Vera
Polez, aos meus familiares e amigos, e a
todos àqueles ao qual pode ser útil.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo cuidado e gratuito amor durante toda essa caminhada até aqui (e por toda a vida), por me dar a vida, por me manter firme nos desafios do dia a dia, me sustentar e me ensinar a colocar Amor em tudo aquilo que eu faço, dando sentido e plenitude a todas as coisas.

Agradeço aos meus pais, Sebastião e Ana Luíza, e aos meus irmãos, Samuel e Ana Cecília, que são um porto seguro em minha vida, com os quais compartilho a minha história desde a concepção, que me sustentam física e emocionalmente e com os quais cresço a cada dia. Agradeço a Francisca que sem ela, minha vida seria uma bagunça. A Vera Lúcia Gonçalves, que cuidou de mim por muitos anos. E a todos os meus familiares, em especial o tio Álvaro, meus avós e padrinhos.

Agradeço a dra. Vera Polez e ao dr. Thales Rocha, meus pais da ciência, por todas as oportunidades, orientações, cuidados e amizade que me proporcionaram nestes últimos anos, sem os quais este trabalho não seria possível. A Carla Soll, que me acolheu e me ajudou a dar os primeiros passos no LPCB (Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos). Agradeço também a todos que compõem o LPCB, com os quais formamos uma verdadeira equipe, e muitos me ajudaram nos experimentos deste trabalho (em especial a Lívia, Paulo, Alíssa, Garbiela, Paula, Lucas, Arnaldo, Adriana, Pimentel e Tiago). Agradeço ao dr. Luciano Silva, pela amizade, parceria e oportunidades, o qual gentilmente preparou as formulações utilizadas neste trabalho de pesquisa. Agradeço a dra. Marlinda, dr. William, dr. Marcio e a Raimundinha pela amizade, por todos os suportes e ensinamentos para que este e anteriores trabalhos fossem realizados. Agradeço a dra. Arailde Urben pelos cogumelos e livros, e ao dr. Clenilson Martins e dr. Carlos Bloch pelos materiais liofilizados. Agradeço ao

chefe administrativo Jorge Madeira e aos demais funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo suporte.

Agradeço a Universidade de Brasília e a todo o corpo docente e discente da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, pela contribuição à minha formação.

Agradeço, em especial, à Profa. Ana Maria Resende Junqueira, que me orientou na realização deste Trabalho de Conclusão de Curso. Foram muitas reuniões, horas de discussão sobre os melhores caminhos a seguir em tempos de pandemia. Decisões importantes sobre o que seria pesquisado e de como seriam apresentados os resultados, foram tomadas sobre a sua supervisão. Sem seu acolhimento e orientação não concluiríamos este trabalho.

Agradeço às minhas amigas do Regional Segura Elas, Iza, Nath, Karol e Any, por compormos muitas histórias juntas, e ao nosso professor e amigo, Lucas de Campos. Agradeço ao Noeliton, a Vívian e a Joelle, por me acompanharem de pertinho. Agradeço ao pe. Cristiano, à comunidade da Paróquia Divino Espírito Santo e aos amigos do Opus Dei, por serem meu sustento. Agradeço a Nathália Assis e ao Arthur d'Almeida pela amizade de muitos anos e todo o suporte.

E enfim, a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação acadêmica e humana, que se eu não corresse o risco de esquecer algum nome, escreveria todos. Minha eterna gratidão!

“A ciência não é somente compatível com a espiritualidade, ela é uma fonte profunda de espiritualidade”

-Carl Sagan

RESUMO

AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E BEADS DE ALGINATO CONTENDO EXTRATOS DE COGUMELOS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*.

O fitonematoide *Meloidogyne incognita* é uma praga agrícola que ocasiona perdas significativas no cultivo de diferentes commodities. Dentre as estratégias de controle, a mais utilizada é a aplicação de nematicidas sintéticos, que em sua maioria apresentam elevados riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Assim, existe uma demanda para o uso de produtos eco-amigáveis, como por exemplo, os defensivos agrícolas naturais. Contudo, um dos desafios para o uso dessa estratégia é a padronização e análise de formulações que visem aumentar a eficiência e diminuir possíveis danos ao meio ambiente. Diante deste panorama, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar a ação nematotóxica *in vitro* de extratos aquosos de micélios de cogumelos nanoestruturados em nanopartículas de quitosana e em *beads* de alginato. Micélios de duas espécies de cogumelos (C1 e C2) foram produzidos em cultivo submerso e utilizados para produção dos extratos aquosos (EA-C1 e EA-C2) e posteriormente, para a síntese das formulações: i. nanopartículas de quitosana contendo os extratos (NP-EA-C1 e NP-EA-C2) na forma livre, ii. nanopartículas de quitosana contendo os extratos encapsuladas em *beads* de alginato (Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2). As formulações foram analisadas quanto às características macroscópicas e em bioensaios *in vitro* contra *M. incognita*. As formulações sem a presença dos extratos não apresentaram ação contra o fitonematoide (ação inerte). As formulações contendo os extratos (NP-EA-C1, NP-EA-C2, Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2) apresentaram ação nematotóxica. Contudo, as formulações contendo as nanopartículas com os extratos não foi possível avaliar se a ação foi nematicida ou nematostática devido à mucoadesividade das formulações comprometendo os bioensaios de recuperação dos fitonematoides. As formulações contendo os *beads* com as nanopartículas (Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2), apresentaram ação nematicida, indicando um potencial defensivo agrícola natural que poderá contribuir para o manejo integrado do fitonematoide.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*, Agricultura, Nematicida Natural, Biodefensivo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Raiz de <i>N. tabacum</i> infectada com galhas de <i>M. incognita</i>	24
Figura 2. Câmara de eclosão.....	24
Figura 3. Câmara de eclosão contendo ovos de <i>M. incognita</i>	25
Figura 4. Cultivo submerso.....	26
Figura 5. Micélio liofilizado.....	27
Figura 6. Crescimento dos micélios das espécies C1 e C2.....	30
Figura 7. Formulações vazias ou contendo os extratos.....	31
Figura 8. Formulações vazias ou contendo os extratos nanoestruturados.....	32
Figura 9. Bioensaio contra <i>M. incognita</i>	33
Figura 10. Bioensaio de recuperação.....	36
Figura 11. Bioensaio contra <i>M. incognita</i> : A. Nematóide vivo; B. Nematóide morto.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Fitonematoide <i>Meloidogyne incognita</i>	14
3.2. Cogumelos como fontes de produtos naturais para o controle de pragas.....	16
3.3. Formulação de biodefensivo.....	19
3.3.1. Nanopartículas de quitosana.....	19
3.3.2. <i>Beads</i> de alginato.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Material Biológico.....	22
4.1.1. Micélio de cogumelos (Basidiomicetos).....	22
4.1.2. Multiplicação de <i>M. incognita</i> utilizando-se <i>Nicotiana tabacum</i> (variedade xantii).....	23
4.1.3. Juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. incognita</i>	23
4.2. Métodos.....	25
4.2.1. Cultivo submerso dos micélios.....	25
4.2.2. Obtenção do extrato aquoso.....	26
4.2.3. Formulação: Nanopartícula de quitosana.....	27
4.2.4. Formulação: <i>beads</i> de alginato como agente encapsulante dos extratos de cogumelos nanoestruturados em nanopartículas de quitosana.....	28
4.2.5. Bioensaio in vitro contra J2 de <i>M. incognita</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

O uso de defensivos agrícolas naturais para o controle de pragas é uma estratégia importante que contribui para a obtenção de alimentos seguros bem como um menor impacto ao meio ambiente. Os defensivos agrícolas naturais são os produtos provenientes de partes de, ou compostos por plantas, microrganismos, animais e minerais (HALFELD-VIEIRA et al., 2016). Em 2020 foi decretado o Programa Nacional de Bioinsumos (decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020) que tem por objetivo “ampliar e fortalecer a utilização de bioinsumos para a promoção do desenvolvimento sustentável da agropecuária brasileira” (MAPA, 2020).

Diversos produtos naturais como óleos essenciais, óleos fixos (ácidos graxos) e extratos de plantas possuem uma complexa e diversificada composição química que podem ser uma fonte promissora de defensivos agrícolas naturais (BRITO et al., 2021). Ademais, existe uma tendência para o uso de outras fontes naturais, como por exemplo, os fungos para o controle de pragas. Os fitonematoides são importantes pragas e existe uma demanda para o controle desses organismos utilizando-se defensivos naturais.

Contudo, a escassez de padronização de formulações e a baixa estabilidade frente às condições do meio agrícola (exemplo, temperatura, luminosidade e umidade) dos defensivos naturais que estão no mercado, são algumas das justificativas para baixa adoção desta categoria de produtos pelos agricultores (BRITO; BALDIN, 2013).

O Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos (LPCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia realiza estudos de prospecção e caracterização de extratos, frações e/ou compostos provenientes de fontes naturais (vegetais, fungos e subprodutos agropecuários) para o controle de pragas. Neste caso, em estudos anteriores (dados não publicados), os extratos aquosos de

micélios (EA-C1 e EA-C2) de duas espécies C1 e C2 de cogumelos, respectivamente, foram caracterizados e apresentaram: ação nematicida em condições *in vitro* contra o fitonematoide *Meloidogyne incognita*, termoestabilidade, sem citotoxicidade (EA-C1) e com citotoxicidade (EA-C2) em células de eucariotos (células de inseto), sem ação contra organismo não alvo (bactérias gram-positivas e gram-negativas) e sem fitotoxicidade. Adicionalmente, foi realizado um experimento em casa de vegetação utilizando-se plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas com *M. incognita* visando avaliar o potencial nematotóxico dos extratos aquosos livres e formulados em *beads* de alginato. Contudo, os *beads* de alginato não liberaram os extratos de forma satisfatória, inviabilizando o controle do fitonematoide.

Assim, existe uma a demanda em avaliar diferentes formulações contendo os extratos aquosos de C1 e C2 para o controle de *M. incognita*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação nematotóxica *in vitro* dos extratos aquosos de micélios de cogumelos nanoestruturados em nanopartículas de quitosana e em *beads* de alginato.

2.2. Objetivos específicos

- Adaptar o protocolo para os ensaios de nematoxicidade *in vitro* utilizando-se as diferentes formulações.
- Avaliar as formulações à base de nanopartículas de quitosana contendo os extratos aquosos das espécies C1 e C2 referente à ação nematotóxica contra *M. incognita*.

- Avaliar as formulações a base de *beads* de alginato contendo as nanopartículas de quitosana associadas aos extratos aquosos das espécies C1 e C2 referente a ação nematotóxica contra *M. incognita*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fitonematoide *Meloidogyne incognita*

No cenário do agronegócio mundial, o Brasil lidera a exportação de diversas commodities agrícolas, como a soja, o café e o açúcar, e possui uma posição de relevância na exportação de milho e algodão (ESCHER; SCHNEIDER, 2019). Porém, essa realidade pode ser afetada devido ao ataque severo de fitonematoides, os quais podem gerar prejuízos econômicos estimados em milhões de dólares (ABAD et al., 2008). Os fitonematoides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne* spp. são endoparasitas de um número significativo de espécies vegetais, tais como cana-de-açúcar, soja, algodão, feijão, café, fumo, as frutíferas, as olerícolas entre outras (LOPES et al., 2011).

Após o nematoide parasitar as raízes da planta hospedeira, ele estabelece um sítio de alimentação formado por células nutridoras, da qual obterá os nutrientes necessário para o seu desenvolvimento. As galhas nas raízes são formadas pela planta em resposta ao parasitismo, podendo ser visível um a dois dias após a penetração do juvenil infectante. Outros sintomas como a escassez de radículas, plantas com porte reduzido (nanismo), folhas com anomalias na coloração (sintomas de deficiência nutricional como clorose), murchamento e outros, podem ser observados nas lavouras. Os sintomas da parte aérea em plantas infectadas geralmente são apresentados em “reboleiras” no campo produtivo (FERRAZ; BROWN, 2016).

As principais estratégias de controle do fitonematoide *Meloidogyne incognita* utilizadas consistem na rotação de culturas, na utilização de variedades agrícolas resistentes, no manejo integrado de pragas e na utilização de agrotóxicos químicos sintéticos, sendo este último o método mais utilizado (LOPES et al., 2011). Atualmente, no Brasil existem 52 agrotóxicos registrados para o controle de *M. incognita*, sendo estes de origem sintética, microbiológica e vegetal. Muitos dos nematicidas sintéticos registrados apresentam algum grau de toxicidade à saúde humana e animal, e em sua maioria são classificados como “Produto Muito Perigoso ao Meio Ambiente” (AGROFIT, 2021).

Em maio de 2020, foi instituído o Programa Nacional de Bioinsumos pelo Decreto Nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Sob coordenação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o programa tem por objetivo favorecer e ampliar a utilização de bioinsumos a fim de promover o desenvolvimento sustentável da agropecuária brasileira. Dessa forma, através de políticas, programas, marcos regulatórios, instrumentos de crédito e fomento, favorecerão o desenvolvimento de bioinsumos e a sua utilização na produção vegetal, na produção animal, na pós-colheita e no processamento dos produtos (MAPA, 2020).

Os recursos naturais são fontes importantes de compostos complexos e capacidade alta de interação com diferentes sistemas biológicos. Neste caso, o metabolismo secundário dos cogumelos são fontes de compostos que podem ser utilizados como bioinsumos para o controle de pragas (SIVANANDHAN et al., 2017).

3.2. Cogumelos como fontes de produtos naturais para o controle de pragas

Os cogumelos (basidiomicetos) são macrofungos que possuem diversas aplicações gastronômicas, farmacêuticas, ambiental, agrícola e entre outras (WANG et al., 2006; SIVANANDHAN et al., 2017; URBEN; OLIVEIRA, 2017; POLEZ, 2017; BASSO et al., 2020). A presença de proteínas de alta qualidade, carboidratos, lipídeos (ex. ômega), vitaminas e fibras demonstram a sua importância nutricional, mas também são fontes de substâncias bioativas (ex.: beta glucanas, o ergosterol, as lectinas, os compostos fenólicos, entre outros) que apresentam diversas atividades biológicas tais como: antitumoral, anti-inflamatório, hipoglicêmico, antioxidante, antiviral, antimicrobiano entre outros (MISHRA et al., 2012; URBEN; OLIVEIRA, 2017; POLEZ, 2017). Adicionalmente, podem ser usados como fontes importantes para o controle de pragas agrícolas (SIVANANDHAN et al., 2017).

Os cogumelos podem ser propagados por intermédio dos esporos (reprodução sexuada), dos segmentos do micélio ou do corpo de frutificação (reprodução assexuada ou vegetativa). Na reprodução sexuada ocorre recombinação genética sendo recomendada para utilização em programas de melhoramento genético (URBEN, 2004). Por outro lado, a reprodução assexuada é comumente utilizada para a produção comercial pois as características da variedade são mantidas. Porém, após diversas replicações, o material perde o vigor (URBEN; OLIVEIRA, 2017).

Diversas espécies de cogumelos (*Pleurotus* spp., *Lentinus* spp., *Ganoderma* spp., *Lentinula* spp., *Agaricus blazei*, *Pycnoporus sanguineus*, *Hypsizygus ulmarius*, *Neonothopanus nambi*, entre outros) e seus sub-produtos podem ser empregados para o controle de nematoides (*M. incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Heterodera schachtii*, *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus* spp, *Bursaphelenchus xylophilus* entre outros). Neste caso, os

cogumelos podem ser usados no controle biológico, com a liberação de toxinas e parasitismo (HEYDARI et al., 2006; KONG, 2013). Adicionalmente, os cogumelos também podem ser utilizados como fontes de compostos químicos naturais, obtidos a partir: i. corpo de frutificação; ii. micélio (parte vegetativa) ou seu exsudato; iii. esporos; iv. sub-produtos (substrato exaurido utilizado para a produção dos corpos frutíferos) (STADLER, et al., 1994; PALIZI, et al., 2009; BUA-ART, et al., 2011; AWD-ALLAH; EL-SHERBINY, 2015; SUFIATE, et al., 2017; SANTOS, et al., 2018; HAHN, et al., 2019; WILLE, et al., 2019; FERREIRA et al., A 2019; TANIMOLA; ADEDOKUN, 2020; AKSHAYA, et al., 2021).

Stadler e colaboradores (1994) verificaram o potencial nematotóxico (nematostática ou nematicida) de basidiomicetos. Neste caso, a prospecção de 220 isolados resultou na seleção de 17 isolados como potenciais produtores de toxinas para o controle de nematoides. As toxinas purificadas obtidas de *Pleurotus pulmonarius* com potencial nematicida contra *C. elegans* são o ácido S-coriólico e o ácido linoleico.

Heydari e colaboradores (2006) avaliaram o controle biológico de *Pleurotus ostreatus* contra juvenis de segundo estágio (fase infectiva) de *M. javanica*, sendo observado inicialmente, uma imobilização do nematoide e posteriormente, a digestão. Neste caso, as toxinas secretadas foram denominadas de ostreatinas. Ademais, também foi observado que o exsudato obtido no cultivo submerso de *P. ostreatus*, em experimento *in vitro*, após 24h apresentou ação nematostática (paralisação total dos nematoides).

El-Sherbiny e Awd-Allah (2014) observaram que o substrato exaurido (triturado para ser usado como um pó) utilizado na produção de *P. ostreatus* reduziu a infecção de *M. incognita* em 67,93% em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). Em estudo similar, utilizando arroz (*Oryza sativa L.*), Awd-

Allah e El-Sherbiny (2015) avaliaram a ação nematotóxica do substrato exaurido (resíduo triturado em forma em pó) do cultivo de *P. ostreatus* em três tratamentos: não decomposto, decomposto por duas semanas e por quatro semanas. O tratamento com resíduo decomposto por quatro semanas apresentou o melhor resultado tanto para o controle do nematoide de cistos, *Heterodera goldeni* (84,11%) quanto para a redução de 80% de galhas e massas de ovos de *M. incognita*, resultando em aumento no peso seco e de espiguetas por planta.

A utilização do micélio (parte vegetativa) dos cogumelos em cultivo submerso apresenta diversas vantagens tais como: i. crescimento rápido (8 a 14 dias) quando comparado com espécies crescidas naturalmente; ii. crescimento em condições mais controladas que resulta na produção de compostos químicos mais homogêneos de acordo com as condições determinadas (LIN; SUNG, 2006; SILVA et al., 2016). O tipo de composto químico produzido bem como a quantidade a ser sintetizada pode variar de acordo com diversas condições: a escolha da espécie, a seleção de linhagens; o tipo de substrato utilizado no cultivo; o uso da parte vegetativa (micélio); o uso do corpo frutífero e a presença de agentes estressores abióticos (ex.: pH, temperatura, luminosidade, estresse hídrico e salino entre outros) ou bióticos (ex. insetos, fungos, bactérias, nematoide entre outros). Para o controle de pragas, os cogumelos (corpos frutíferos ou micélios) ou seus subprodutos podem ser usados na forma de extratos ou compostos isolados (CALVO et al, 2002).

Neste caso, a forma que o princípio ativo presente (cogumelo) será disponibilizado poderá influenciar a sua eficiência. Assim, é fundamental a formulação adequada do produto de origem natural de acordo com o seu destino na agricultura almejada.

3.3. Formulação de biodefensivo

As formulações têm como objetivo aumentar a eficiência e diminuir possíveis danos ao meio ambiente. Formular um agroquímico ou um bioproduto agrícola consiste em preparar os componentes ativos (extratos ou compostos) na concentração adequada, adicionando substâncias coadjuvantes ou outros componentes na sua composição.

3.3.1. Nanopartículas de quitosana

A nanobiotecnologia é uma área promissora e integra várias ciências como a física, a química, a biologia e a ciência de materiais. As nanopartículas, devido ao seu tamanho em nanoescala, em geral entre 1 e 100nm, podem apresentar propriedades novas ou melhoradas baseadas nas suas características específicas (tamanho, distribuição, morfologia, fase entre outras) quando comparadas com partículas de maiores dimensões provenientes da mesma fonte onde as nanopartículas foram formadas (KRUMOV et al., 2009). Deste modo, o encapsulamento de substâncias em nanossistemas torna-os mais eficazes em função das propriedades físico-químicas tais como tamanho e a carga de superfície, e podem ser manipuladas de acordo com as concentrações dos componentes presentes nesses sistemas

As nanoformulações, devido ao menor tamanho de partícula, aumentam a área de superfície e conferem maior mobilidade à substância, apresentando uma maior eficiência e eficácia quando comparadas com outros tipos de formulações (KASHYAP et al., 2015). Ademais, esses nanossistemas podem ser sintetizados utilizando-se estratégias verdes para a sua produção, como por exemplo, o uso de polímeros naturais. Os polímeros naturais são gerados como resíduos

secundários, a partir do processamento de plantas, animais e microorganismos (JOANITTI; SILVA, 2014).

A quitosana é um importante exemplo de polímero natural e suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioadesividade permitem a sua aplicação como base de liberação de compostos e na interação/adesão de estruturas na superfície de células (MATI-BAOUCHE et al., 2014). Possui características antimicrobianas, antioxidantes e quelantes (GEDDA, et al., 2016).

Existem diversas metodologias para extração da quitosana, sendo a mais utilizada comercialmente a desacetilação da quitina (NEGM, et al., 2020). A quitina é extraída, principalmente, das carapaças de crustáceos (caranguejo, lagosta e camarões) mas também está presente no exoesqueleto de insetos e nas paredes dos fungos (ABDOU et al. 2008; ELSABEE; ABDOU, 2013). A quitina obtida a partir de cogumelos (*Allomyces arbuscula*, *Mucor genevensis*, *Tranetes versicolor* e *Agaricus bisporus*) são fontes mais econômicas e renováveis (JONES, et al. 2019).

A quitosana pode ser utilizada para a síntese de nanopartículas e existem diferentes métodos para a sua produção sendo a gelificação ionotrópica muito aplicada quando comparada com outras estratégias mais sustentáveis (KASHYAP et al., 2015). A utilização de nanopartículas pelo encapsulamento de substâncias ativas pode apresentar diversas vantagens como: i. aumentar a eficácia dos componentes químicos, ii. diminuir a toxicidade (menor dosagem); iii. diminuir a contaminação ambiental e iv. reduzir a volatilização (COTA-ARRIOLA et al., 2013).

A quitosana nano estruturada possui aplicações nos setores alimentício, cosmético, biomédico e agrícola. As aplicações da nanoquitosana no setor agrícola podem ser utilizadas para o controle de pragas e plantas invasoras, bem

como para o tratamento de água e regulação do estresse abiótico em plantas (controle do estresse por salinidade, seca, temperatura e metais pesados) (GEDDA, et al., 2016; GALINDO, et al., 2019; BANDARA et al., 2020).

3.3.2. *Beads* de alginato

O alginato é um biopolímero abundante na natureza que pode ser obtido a partir de algumas espécies de algas marrons pertencentes à classe Phaeophyceae e de bactérias do solo como *Azotobacter vinelandii* e algumas espécies de *Pseudomonas* (LINKER; JONES, 1966; GORIN; SPENCER, 1966; GLICKSMAN, 1987; DRAGET et al., 2006). O alginato proveniente das algas marrons é o mais utilizado comercialmente, com destaque para *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitada*, *Ascophyllum nodosum*, *Lessonia*, *Ecklonia* e *Durvillaea* (MCHUGH, 2002; DRAGET et al., 2006). Estas algas podem ser comercialmente produzidas em larga escala e a característica do alginato gerado varia de acordo com as condições de cultivo (MCHUGH, 2002).

Existem diversos tipos de alginato com utilização industrial que variam em peso molecular, na forma de partícula, podendo ser granular ou fibrosa, no conteúdo de cálcio, na proporção de ácido manurônico em relação ao ácido gulurônico, na distribuição de tamanho de partícula e no grau de esterificação do éster de propilenoglicol (GLICKSMAN, 1987).

Os alginatos possuem diversas aplicações no mercado alimentício, cosmético, farmacêutico, têxtil e biotecnológico. Possui a capacidade de reter água e propriedades de gelificação, viscosificação e estabilização, espessante, emulsificante, umectante, espumante e substância inerte (GLICKSMAN, 1987; MCHUGH, 2002; DRAGET et al., 2006; FAO, 2019). Pode ser encontrado como

ácido algínico, alginato de amônio, alginato de cálcio, alginato de sódio, alginato de potássio e alginato de propilenglicol (FAO, 2019).

Dentre as suas utilizações, tem-se a produção de biofilmes e microcápsulas como uma tecnologia de liberação controlada de substâncias ativas, podendo ser medicamentos, pesticidas, conservantes e fragrâncias (TURBIANI et al., 2011; PASQUALIM, et al., 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1. Micélio de cogumelos (Basidiomicetos)

Os isolados miceliais das duas espécies de cogumelo, C1 e C2, foram obtidos no Banco de Cogumelos Comestíveis e Medicinais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF. Inicialmente, estes isolados foram multiplicados vegetativamente em placas de Petri contendo meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25°C, na ausência de luz, por um período de 7 a 10 dias. Após a total colonização das placas, estas foram selecionadas conforme vigor e ausência de contaminantes. Em seguida, discos miceliais de aproximadamente 5mm foram transferidos para novas placas de Petri contendo BDA, a fim de escalonar o material, seguindo as mesmas etapas de incubação e seleção, sugeridas por Urben e Correia (2017), com adaptações.

4.1.2. Multiplicação de *M. incognita* utilizando-se *Nicotiana tabacum* (variedade xantii)

As plantas de *Nicotiana tabacum* foram obtidas a partir de sementes de um único exemplar vegetal, visando obter sementes homogêneas. A semeadura foi realizada em solo autoclavado (adicionado-se areia e adubo) em copo plástico de 500mL. Após o crescimento das plântulas, estas foram transferidas para sacos plásticos pretos contendo o solo autoclavado e depois de 10 dias, as plantas foram infectadas com juvenis de segundo estágio (J2), sendo cerca de 2.000 nematoides por planta. Posteriormente, após três meses, as plantas infectadas foram utilizadas como fontes de ovos para a obtenção de J2, fase infectiva de *M. incognita*.

4.1.3. Juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*

Os juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* foram obtidos a partir das raízes *N. tabacum* infectadas (Figura 2), mantidas em casa de vegetação. Seguindo a metodologia de Hussey e Barker (1973) e funil de Baermann (1917) modificado, as raízes foram trituradas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% a fim de extrair as massas de ovos nelas contidas, que estavam recobertas por uma matriz gelatinosa. Após a trituração, os ovos foram isolados utilizando peneiras justapostas de 100, 250 e 500 mesh, e posteriormente armazenados em câmaras de eclosão (Figura 3 e 4) à temperatura ambiente para obtenção dos juvenis. Após 48h foi obtida a primeira eclosão de J2.



Figura 1. Raiz de *N. tabacum* infectada com galhas de *M. incognita*.



Figura 2. Câmara de eclosão.



Figura 3. Câmara de eclosão contendo ovos de *M. incognita*.

4.2 Métodos

4.2.1. Cultivo submerso dos micélios

Os micélios isolados das espécies selecionadas foram cultivados sob fermentação submersa controlada (pH, temperatura, luminosidade, agitação e meio de cultura), a fim de obter um material homogêneo, abundante, de rápido crescimento e livre de contaminantes. Inicialmente, foi feito o pré inóculo (Figura 5), onde amostras do micélio (três a quatro cubos de 1cm²), anteriormente replicado em placa de Petri contendo meio BDA, foram adicionados a Erlenmeyers contendo meio líquido batada-dextrose (BD) e ácido láctico 20% autoclavados. Seguidamente, foram incubados na ausência de luminosidade a 25°C sob agitação contínua (120 rpm). Após o crescimento inicial da biomassa miceliar, o material foi escalonado em Erlenmeyers contendo um volume de meio BD superior ao inicial, mas com características idênticas de composição, sendo igualmente incubados por um período de 8 a 14 dias. Por fim, o material obtido

foi filtrado com intuito de separar a biomassa micelial do sobrenadante, método adaptado de Carvajal et al. (2012).

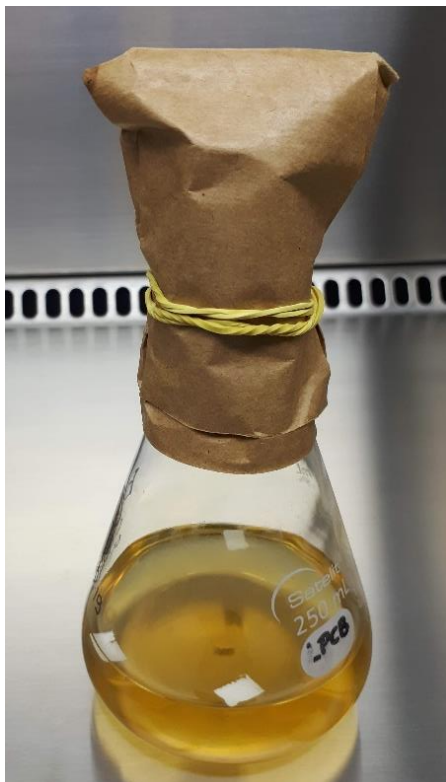


Figura 4. Cultivo submerso

4.2.2. Obtenção do extrato aquoso

A biomassa micelial isolada proveniente do cultivo submerso das espécies C1 e C2 foi liofilizada e processada para obtenção do extrato aquoso do micélio (EA-C1 e EA-C2) de acordo com ROCHA e colaboradores (2017) modificado. O micélio liofilizado (Figura 6) foi triturado com o auxílio de um Turrax, transformando-se em pó, e posteriormente diluído em água destilada e centrifugado (3.000 rpm, 3 minutos) a fim de descartar o pellet formado.



Figura 5. Micélio liofilizado

4.2.3. Formulação: Nanopartícula de quitosana

A preparação das formulações foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia coordenado pelo Dr. Luciano Paulino da Silva.

As nanopartículas de quitosana (NPs) foram sintetizadas utilizando o método de gelificação (CALVO et al., 1997). O método é baseado na complexação entre espécies de cargas opostas, ou seja, pela interação eletrostática entre grupamentos amino (proveniente de polímeros positivamente carregados como a quitosana) e as cargas negativas de poliânions. Primeira etapa: a quitosana foi dissolvida em uma solução aquosa de ácido fraco para a protonação dos grupos amino da cadeia, tornando-se catiônica, possibilitando a sua interação com outras moléculas. Segunda etapa: a solução de quitosana positiva interage com um agente reticulante polianiónico (no presente trabalho foi utilizado o tripolifosfato pentassódico, TPP), o TPP foi adicionado por gotejamento controlado e sob agitação contínua à solução resultando na formação de um complexo. Terceira etapa: adição por gotejamento controlado do extrato (EA-C1

ou EA-C2) sob agitação contínua à solução, para a obtenção das nanopartículas (NP-EA-C1 ou NP-EA-C2), sendo armazenadas à 4°C para uso futuro.

4.2.4. Formulação: *beads* de alginato como agente encapsulante dos extratos de cogumelos nanoestruturados em nanopartículas de quitosana

A preparação das formulações foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia coordenado pelo Dr. Luciano Paulino da Silva.

O método de gelificação ionotrópica (BURGESS, HICKEY, 1994) foi utilizado para a síntese das microesferas de hidrogel (estrutura poliméricas que contém quantidade de água elevada). Os *beads* de alginato contendo o material (NP-EA-C1 ou NP-EA-C2) encapsulado foram obtidos seguindo as etapas a seguir. Primeira etapa: foi realizado pela adição de uma solução de alginato de sódio na solução contendo o material (NP-EA-C1 ou NP-EA-C2). Segunda etapa: foi adicionado por gotejamento controlado e sob agitação contínua para a obtenção dos *beads* (Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2-Be) contendo os materiais NP-EA-C1 e NP-EA-C2, respectivamente. Terceira etapa: os *beads* (Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2-Be) foram lavados com água destilada, e em seguida foram armazenados à 4°C para uso futuro. Este tipo de formulação permite uma liberação prolongada dos compostos bioativos e apresenta características de biocompatibilidade e biodegradabilidade.

4.2.5. Bioensaio *in vitro* contra J2 de *M. incognita*

Os bioensaios *in vitro* contra J2 de *M. incognita* teve por objetivo avaliar a capacidade nematotóxica das formulações. Os bioensaios foram realizados de

acordo com ROCHA e colaboradores (2017) modificado. O experimento foi desenvolvido em microtubo de 1,5mL com uma solução total de 1mL. Em cada microtubo foi adicionado aproximadamente 90 J2/mL e os tratamentos em triplicata. Os tratamentos utilizados, correspondem: i. controle negativo (água); ii. controle positivo (álcool 70%); iii. extrato aquoso de C2 (EA-C2); iv. extrato aquoso de C1 (EA-C1); v. Nanopartícula de quitosana (NP); vi. *Beads* de alginato vazio (Be); vii. NP-EA-C2; viii. Be-NP-EA-A2; viii. NP-EA-C1; e ix. Be-NP-EA-C1. As amostras foram incubadas por 48h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a primeira leitura em microscópio óptico, a fim de contabilizar os nematoides que estavam movimentando ou paralisados.

Após a primeira leitura, as amostras que apresentaram nematoides paralisados foram centrifugadas (5.000 rpm durante 5 minutos), sendo o sobrenadante descartado e os nematoides ressuspensos em 1mL de água destilada, realizando uma tríplice lavagem. Após 24h realizou-se uma nova leitura em microscópio óptico. Este processo tem por objetivo retirar o tratamento que estava em contato direto com os nematoides e observar se estes vão recuperar o movimento. Assim, foi possível avaliar se os tratamentos possuem ação nematotóxica ou nematostática, isto é, se provocam a morte ou paralisam os nematoides.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo submerso dos micélios

Os fungos são utilizados por diversas empresas para a produção em larga escala de metabólitos, proteínas, enzimas, entre outros compostos para diversas aplicações industriais e o cultivo submerso é uma estratégia para a produção em escala dos micélios cogumelos.

Os cultivos submersos (Figura 6) das duas espécies de cogumelos utilizadas no presente trabalho apresentaram um desenvolvimento vigoroso de biomassa miceliar, com características homogêneas e livre de agentes contaminantes.

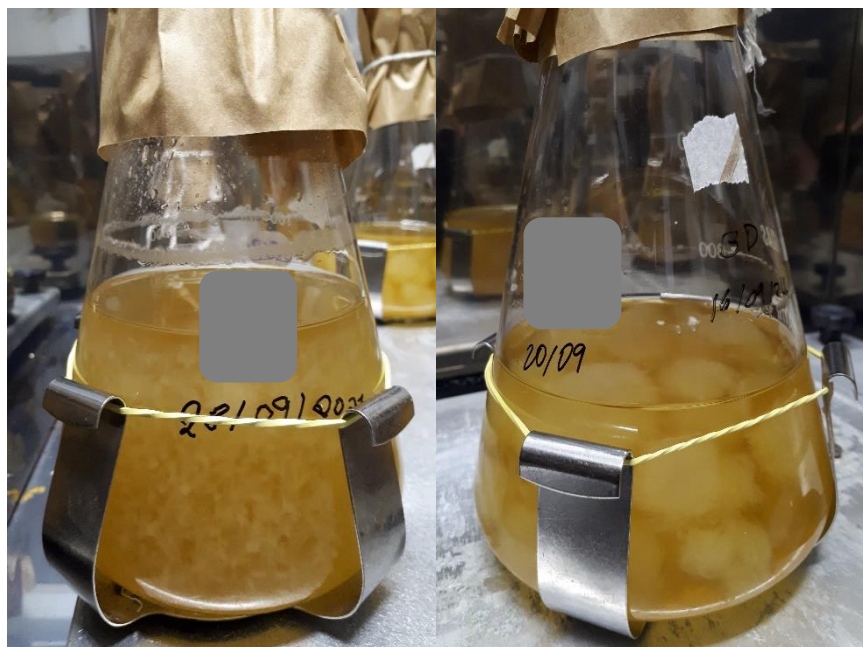


Figura 6. Crescimento dos micélios das espécies C1 e C2.

5.2. Formulações contendo os extratos aquosos de cogumelo

As formulações à base de nanopartículas de quitosa ou *beads* contendo as nanopartículas de quitosana apresentaram características de coloração e resistência diferenciados.

A formulação das nanopartículas de quitosana vazia (NP) apresentou a formação de grumos incolores homogêneos, enquanto as formulações de NP contendo os extratos EA-C1 e EA-C2, apresentaram grumos homogêneos de coloração amarelada (Figura 7).

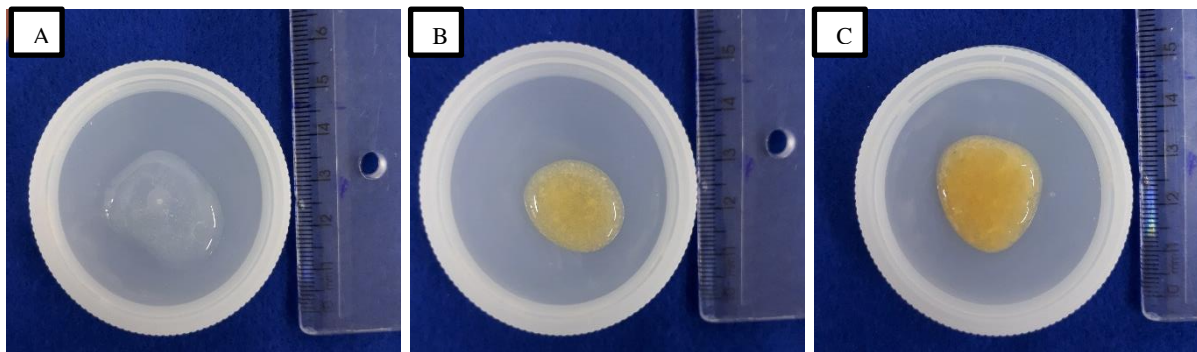


Figura 7. Formulações vazias ou contendo os extratos: A. Nanopartícula de quitosana vazia (NP); B. Nanopartícula de quitosana com EA-C1 (NP-EA-C1); C. Nanopartícula de quitosana com EA-C2 (NP-EA-C2).

A formulação de *beads* de alginato vazio apresentaram esferas uniformes e incolores, enquanto os *beads* contendo os extratos nanoencapsulados (Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2) apresentaram as microesferas de aparência não uniforme e de coloração amarelada. Na avaliação por estímulo mecânico, observou-se que as esferas dos *beads* vazios apresentaram maior resistência quando comparadas com os *beads* contendo as nanopartículas (NP-EA-C1 ou NP-EA-C2). As alterações na aparência, na uniformidade, no formato e na capacidade de resistência ao estímulo mecânico dos *beads* de alginato foram observadas em formulações contendo diferentes concentrações de solução de alginato de sódio com óleo vegetal (PASQUALIM et al., 2020). TURBIANI e colaboradores (2011) observaram que o tempo de permanência dos *beads* na solução de cloreto de cálcio é diretamente proporcional à espessura da parede. Quanto mais espessa a parede da microcápsula, mais lentamente o composto ativo é liberado. No presente trabalho, os *beads* foram imediatamente lavados com água destilada para remover o cloreto de cálcio para manter a espessura da parede mais fina visando facilitar a liberação do extrato.

No presente trabalho, foi possível observar visualmente (Figura 8) que a quantidade dos extratos (EA-C1 e EA-C2) nanoestruturados (NP-EA-C1 e NP-EA-C2) foi distinta nas esferas reticuladas. Devido a este fator, foi utilizado apenas a solução liberada pelos *beads* no bioensaio contra J2 de *M. incognita*.



Figura 8. Formulações vazias ou contendo os extratos nanoestruturados: A. *Beads* de alginato vazio; B. *Beads* de alginato com NP-EA-C1; C. *Beads* de alginato com NP-EA-C2.

5.3. Bioensaio contra J2 de *M. incognita*

Os juvenis de segundo estágio de *M. incognita* extraídos das raízes de *N. tabacum* apresentaram excelente qualidade, com movimento vermiforme vigoroso e condição corpórea normal, sendo utilizados no bioensaio de nematoxicidade. Estes fitonematoides são animais aquáticos que sobrevivem no filme ou película de água existente entre as partículas de solo (FERRAZ; BROWN, 2016).

No bioensaio, o controle de água teve como objetivo avaliar a qualidade da água utilizada na confecção dos extratos e das formulações, e utilizar como padrão na avaliação do comportamento dos nematoides vivos, que apresentam movimentação vermiforme. Como esperado, o controle água apresentou 99% de nematoides vivos (Figura 9). O controle positivo, utilizando álcool 70%, com ação nematicida, teve como objetivo servir como padrão para avaliar os nematoides mortos, que em sua maioria apresentam um corpo estático e ereto, o que pôde ser observado em 100% dos nematoides tratados com o álcool (Figura 9).

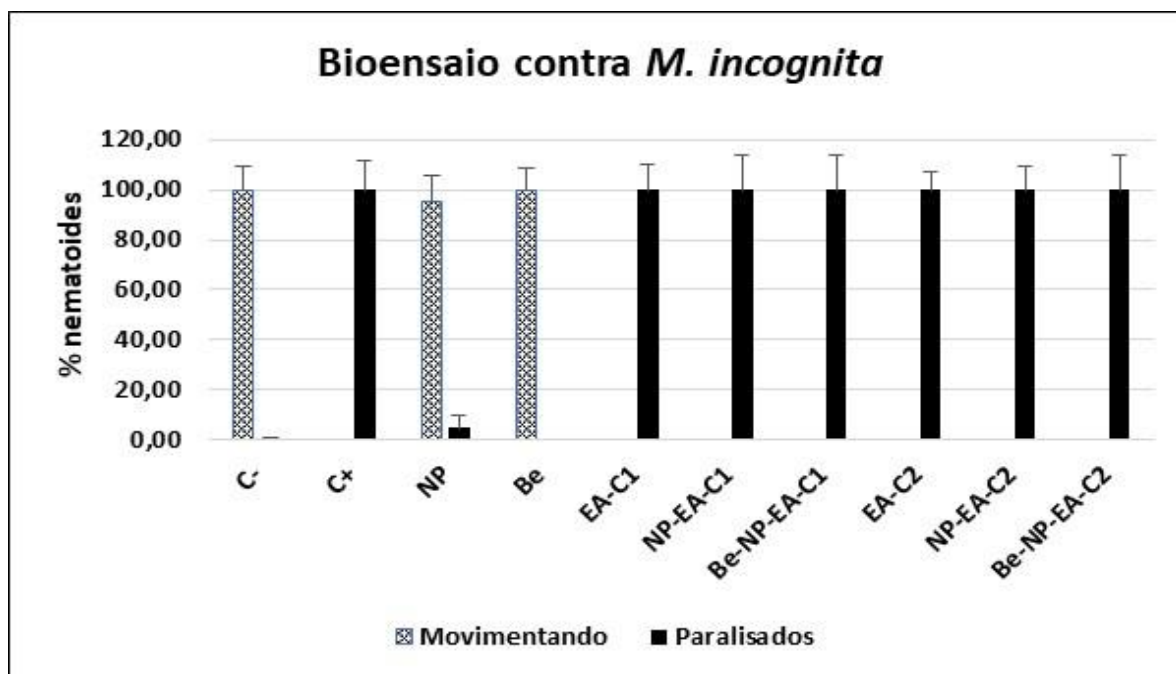


Figura 9. Bioensaio contra *M. incognita*: controles: C- (água), C+ (etanol), NP (nanopartículas de quitosana vazia), Be (*beads* vazio); amostras: EA-C1 (extrato aquoso da espécie C1), NP-EA-C1 (nanopartículas de quitosana contendo o extrato da espécie C1), Be-NP-EA-C1 (*beads* contendo extrato aquoso da espécie C1 nanostruturado em nanopartículas de quitosana), EA-C2 (extrato aquoso da espécie C2), NP-EA-C2 (nanopartículas de quitosana contendo o extrato da espécie C2), e Be-NP-EA-C2 (*beads* contendo extrato aquoso da espécie C2 nanostruturado em nano partículas de quitosana).

Os extratos aquosos dos cogumelos C1 e C2 (EA-C1 e EA-C2) apresentaram 100% mortalidade contra *M. incognita*. Estes resultados corroboram com resultados obtidos em experimentos anteriores, não sendo necessária a realização do bioensaio de recuperação destes tratamentos devido a presença de vacúolos no corpo desses nematoides.

Wille e colaboradores (2019) avaliaram a ação de extratos aquosos de dez espécies de cogumelos contra *M. incognita* em experimentos *in vitro* e *in vivo* em cultura de alface (*Lactuca sativa* cv. Regina). Nos experimentos *in vitro*, todos os extratos apresentaram ação nematotóxica contra os juvenis do segundo estágio (J2). Os quatro extratos mais efetivos contra *M. incognita* foram utilizados nos experimentos em casa de vegetação e reduziram, em média, 70% da reprodução

dos nematoides presentes no solo do cultivo da alface. Dentre as espécies avaliadas, o extrato de *P. ostreatus* nos experimentos *in vitro* e *in vivo* apresentou mortalidade de 100% de J2 e redução de 74% de ovos, respectivamente.

Em trabalhos similares, Akshaya e colaboradores (2021), observaram que o extrato livre de células (exsudato) miceliar de *G. lucidum*, obtido a partir do sobrenadante do cultivo submerso filtrado, apresentou ação ovicida de 92,3% e 93,2% contra J2 de *M. incognita* em experimentos *in vitro*.

No presente estudo, os controles das formulações, nanopartículas de quitosana vazias (NP) e *beads* de alginato vazios (Be), não apresentaram ação nematotóxica, onde foi observado que 95% e 100% dos fitonematoides apresentaram movimento normal, respectivamente (Figura 10). Neste caso, os resultados desses controles foram similares ao controle água (99% dos fitonematoides em movimento). Assim, as formulações sem a presença dos extratos foram consideradas como componentes inertes.

Os nanossistemas do presente trabalho foram sintetizados utilizando-se estratégias verdes para a sua produção, como por exemplo, o uso de polímeros naturais (quitosana). Os tratamentos com as nanopartículas de quitosana contendo os extratos (NP-EA-C2 e NP-EA-C1) foram capazes de paralisar 100% dos nematoides após 48 horas (Figura 10). Porém, devido a mucoadesividade das nanopartículas de quitosana, o ensaio de recuperação foi comprometido, devido a uma grande perda dos organismos durante o processo de lavagem. Na tentativa de avaliar se os tratamentos tinham ação nematicida ou nematostática, sem a necessidade de realizar a lavagem, foi utilizado um protocolo de Xiang e Lawrence (2016) onde era usado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) para verificar se os nematoides paralisados voltariam ou não a se movimentarem.

Contudo, o protocolo demonstrou-se inviável, devido ao tempo necessário para se observar os espasmos dos organismos vivos (cerca de 1-1,5 minutos/nematoide) em relação a quantidade de nematoides a serem avaliados

(aproximadamente 100 nematoides por lâmina). Neste caso, será necessário adaptações dos protocolos para a avaliação dos bioensaios de recuperação.

Entretanto, os dados do presente trabalho já evidenciam a ação nematotóxica das NP contendo os extratos nanoestruturados. O próximo passo será realizar uma curva de concentração dessas amostras para verificar qual será a menor dosagem a ser utilizada para o controle de *M. incognita*. Neste caso, as formulações que utilizam estratégias de nanotecnologia, devido ao menor tamanho de partícula, aumentam a área de superfície e podem conferir uma maior mobilidade ao composto, apresentando uma maior eficiência e eficácia quando comparado com outros tipos de formulações (KASHYAP et al., 2015) sendo necessário verificar qual será a menor dosagem para o controle de *M. incognita*.

As formulações com os *beads* contendo os extratos nanoestruturados, Be-NP-EA-C1 e Be-NP-EA-C2, apresentaram paralisação de 100% dos fitonematoides (Figura 10). No bioensaio de recuperação os *beads* com os extratos nanoformulados apresentaram ação nematicida, com 100% de efetividade (Figura 11). Na literatura não há relatos de formulações com extratos de cogumelos encapsulados em *beads* de alginato com fins agrícolas. Contudo, existem relatos de *beads* contendo os extratos para fins alimentícios e medicinais (MIRMAZLOUM et al., 2021; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, et al., 2017; PETROVIĆ et al., 2019). Na literatura também é possível encontrar trabalhos que avaliaram a reticulação de micélio de cogumelo em alginato para ser utilizado como "semente" no cultivo de cogumelo (ORTIZ et al., 2017).

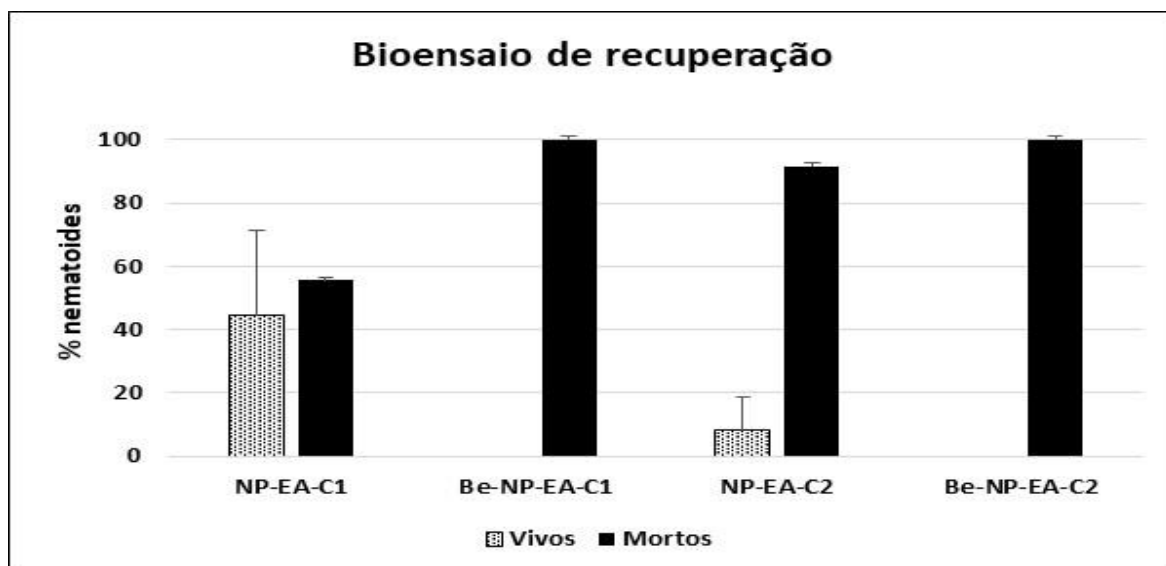


Figura 10. Bioensaio de recuperação: NP-EA-C1 (nanopartículas de quitosana contendo o extrato da espécie C1), Be-NP-EA-C1 (*beads* contendo extrato aquoso da espécie C1 nanostruturado em nanopartículas de quitosana), NP-EA-C2 (nanopartículas de quitosana contendo o extrato da espécie C2) e Be-NP-EA-C2 (*beads* contendo extrato aquoso da espécie C2 nanostruturado em nanopartículas de quitosana).

Deste modo, no presente trabalho, as formulações contendo os extratos nanoformulados em nanopartículas de quitosana livre ou em *beads* de alginato de apresentaram ação nematotóxica contra *M. incognita*. Essas informações são importantes para a otimização de protocolos para a obtenção de formulações que visem a produção de defensivos agrícolas naturais para o controle de pragas, como por exemplo, *M. incognita*.



Figura 11. Bioensaio contra *M. incognita*: A. Nematóide vivo; B. Nematóide morto.

6. CONCLUSÃO

As nanopartículas de quitosana e o *beads* de alginato, sem a presença dos extratos, não apresentaram ação nematotóxica contra J2 de *M. incognita* e podem ser consideradas como elementos inertes a serem utilizados em formulações.

As formulações de nanopartículas de quitosana com os extratos dos cogumelos C1 e C2 apresentaram ação nematotóxica, mas existe a necessidade de aprimorar a metodologia utilizada para avaliar o seu potencial nematicida ou nematostático.

As formulações à base de *beads* de alginato com nanopartícula de quitosana contendo os extratos de cogumelo C1 e C2 apresentaram ação nematicida em condição *in vitro* contra *M. incognita*, indicando um potencial defensivo agrícola natural a ser incorporado ao manejo integrado do fitonematoide *M. incognita* em condição de campo.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.

ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1359-1367, 2008.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em: 23/10/2021.

AKSHAYA, S. B.; KRISHNAMOORTHY, A. S.; NAKKEERAN, S.; POORNIMA, K.; SIVAKUMAR, U. Inhibitory potential of ethyl acetate extract from mushrooms against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 9, n. 1, p. 528-534, 2021.

AWD-ALLAH, S. F. A; EL-SHERBINY, A. A. Non chemical control of *Heterodera goldeni* and *Meloidogyne incognita* on rice plants using residues of oyster mushroom cultivation and supernatant of *Bacillus thuringiensis* before transplanting under field microplots conditions. **Egyptian Journal of Agronematology**, v. 14, n. 1, p. 62-77, 2015.

BAERMANN, G. Eine einfache method zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Ned. Indie*, v. 57, p. 131-137, 1917.

BANDARA, S. et al. Agricultural and biomedical applications of chitosan-based nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. 1903, 2020.

BASSO, A. M. M. et al. Immunomodulatory activity of β -glucan-containing exopolysaccharides from *Auricularia auricular* in phagocytes and mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology**, v. 58, n. 2, p. 227-239, 2020.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Modification of functional quality of beer by using microencapsulated green tea (*Camellia sinensis* L.) and Ganoderma mushroom (*Ganoderma lucidum* L.) bioactive compounds. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, v. 23, n. 4, p. 457-471, 2017.

BRITO, E. F. de; BALDIN, E. L. L. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas em tomateiro. **Tópicos especiais em proteção de plantas**, p. 117, 2013.

BRITO, W. A. de et al. Botanical insecticide formulation with neem oil and D-limonene for coffee borer control. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 56, 2021.

BUA-ART, S. et al. Effect of bioactive compound from luminescent mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) and non-target organisms. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 331-341, 2011.

BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. **In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. Encyclopedia of Pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 66, n. 3, p. 447–459, 2002.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, 1997.

CARVAJAL, A. E. S. S.; KOEHNLEIN, E. A.; SOARES, A. A., ELER, G. J.; NAKASHIMA, A. T. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting

bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. **LWT – Food Sci. Technol**, v.46, p, 493–499, 2012.

COTA-ARRIOLA, O. et al. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1525-1536, 2013.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; STOKKE, B.T. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2-3, p. 170-175, 2006.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosanbased edible films and coatings: A Review. **Material Science and Engineering**, v. 33, p. 1819-1841, 2013.

EL-SHERBINY, A. A.; AWD-ALLAH, S. F. A. Management of the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on Tomato Plants by Pre-Planting Soil Biofumigation with Harvesting Residues of Some Winter Crops and Waste Residues of Oyster Mushroom Cultivation under Field Conditions. **Egyptian journal of agronematology**, v. 13, n. 1, p. 189-202, 2014.

ESCHER, F.; SCHNEIDER, S. Capitalismo, agricultura e desenvolvimento no brasil: uma contribuição para o debate atual. In: SAUER, S. (org.). **Desenvolvimento e transformações agrárias: brics, competição e cooperação no sul global**. São Paulo: Outras Expressões, p. 71-106, 2019.

FAO. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Codex Alimentarius: general standard for food additives. **Codex Alimentarius: general standard for food additives**. p. 74-215. 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/gsfaonline/index.html?lang=en>.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **Manaus: Norma Editora**, v. 1, p. 251, 2016.

FERREIRA, J. M. et al. First report of the nematicidal activity of *Flammulina velutipes*, its spent mushroom compost and metabolites. **Biotech**, v. 9, n. 11, p. 1-6, 2019.

GALINDO, M. V. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante de filmes comestíveis de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. e019008-e019008, 2019.

GEDDA, G. et al. Green synthesis of carbon dots from prawn shells for highly selective and sensitive detection of copper ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 396-403, 2016.

GLICKSMAN, M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. In: **Twelfth international seaweed symposium**. Springer, Dordrecht, p. 31-47, 1987.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. **Canadian journal of chemistry**, v. 44, n. 9, p. 993-998, 1966.

HAHN, M, H. et al. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, v. 138, p. 104024, 2019.

HALFELD-VIEIRA, B. de A. et al. Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 2016.

HEYDARI, R.; POURJAM, E.; GOLTAPEH, E. Mohammadi. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 2, p. 173-177, 2006.

HUSSEY, R. S.; BARKER, KR. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique". *Plant Disease Reporter*, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.

JOANITTI, G. A.; SILVA, L. P. The emerging potential of by-products as platforms for drug delivery systems. **Current drug targets**, v. 15, n. 5, p. 478-485, 2014.

JONES, M. et al. Waste-derived low-cost mycelium nanopapers with tunable mechanical and surface properties. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 9, p. 3513-3523, 2019.

KASHYAP, P. L.; XIANG, X.; HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **International journal of biological macromolecules**, v. 77, p. 36-51, 2015.

KONG, C. et al. Evaluation of *Stropharia sp.* 1.2052 nematicidal effects against *Meloidogyne incognita* on tomato. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 50, p. 5737-5741, 2013.

KRUMOV, N. et al. Production of inorganic nanoparticles by microorganisms. **Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 1026-1035, 2009.

LIN, E. S.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 2, p. 182–187, 2006.

LINKER, A.; JONES, R. S. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 16, p. 3845-3851, 1966.

LOPES, E.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; VIEIRA, B. S. Nematoides das galhas. Artigo revisado partir de Mitkowski, N.A. and G.S. Abawi. 2003. **The Plant Health Instructor**. 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Bioinsumos - Nota Técnica. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/material-para-imprensa/pt/release-04-programanacionalbioinsumos_divulgacao.

Acessado em: 02/12/2021.

MATI-BAUCHE, N.; ELCHINGER, P. H.; BAYNAST, H.; PIERRE, G.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Chitosan as an adhesive. **European Polymer Journal**, v. 60, p. 198-212, 2014

MCHUGH, D. J. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación**, 2002.

MIRMAZLOUM, I. et al. Co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and Reishi medicinal mushroom (*Ganoderma lingzhi*) extract in moist calcium alginate *beads*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 461-470, 2021.

MISHRA, K. K.; PAL, R. S.; ARUNKUMAR, R. Antioxidant activities and bioactive compound determination from caps and stipes of specialty medicinal mushrooms *Calocybe indica* and *Pleurotus sajor-caju* (higher basidiomycetes) from India. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 16, n. 6, 2014.

NEGM, N. A. et al. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 681-702, 2020.

ORTIZ, G.; COLAVOLPE, M. B.; ALBERTÓ, E. Artificial spawn generation based on alginate encapsulated mycelium as inoculum for mushroom cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 34, p. 1776-1783, 2017.

PALIZI, P. et al. Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). **Journal of Plant Protection Research**, 2009.

PASQUALIM, P. et al. Microcápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, 2020.

PETROVIĆ, P. et al. Immobilization of Chaga extract in alginate *beads* for modified release: simplicity meets efficiency. **Hemijaska industrija**, v. 73, n. 5, p. 325-335, 2019.

POLEZ, V. P. L. Cogumelos: fonte de metabolitos para a saúde humana. Ed. Arailde Fontes Urben, Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: Biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. Terceira Edição revisada e ampliada. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília DF; pp 235-252. 2017.

ROCHA, T. L.; SOLL, C. B.; BOUGHTON, 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. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 87-100, 2017.

SANTOS, J. F. S. et al. Interação microbiana e fertilizante Protector® NM no controle de *Meloidogyne incognita*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 11, 2018.

SILVA L.P.; BONATTO C.C.; POLEZ, V. L. P. Green synthesis of metal nanoparticles by fungi: Current trends and challenges. **In: Prasad R. (Eds.), Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology. Fungal Biology**, p. 71-89, 2016.

SIVANANDHAN, S. et al. Biocontrol properties of basidiomycetes: An overview. **Journal of fungi**, v. 3, n. 1, p. 2, 2017.

STADLER, M.; MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of basidiomycetes. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 128-132, 1994.

SUFIATE, B. L. et al. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 216-219, 2017.

TANIMOLA, A. A.; ADEDOKUN, O. M. Nematicidal potentials og aqueous extracts of two mushroom substrate on *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. **Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment**. v. 16, n. 2, p. 110-119, 2020.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Polímeros**, v. 21, p. 175-181, 2011.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, H. C. B. Formulações e preparos de meios de cultura para a produção de “sementes”. **In: URBEN. A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: Biotecnologia e aplicações na**

agricultura e na saúde. Terceira Edição revisada e ampliada. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnologia, p. 49-62, 2017.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, H. C. B.; VIEIRA, W.; CORREIA, M. J.; URIARTT, H. A.; SANTOS, J. K. P.; RIBEIRO, V. L. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2. ed. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 187, 2004.

URBEN, A. F.; CORREIA, M. J. Biologia, morfologia, fisiologia e reprodução de cogumelos. Ed. Arailde Fontes Urben, Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: Biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. Terceira Edição revisada e ampliada. Embrapa Informação Tecnologia, Brasília DF; pp 15-48, 2017.

WANG, H.; NG, T. B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 27-30, 2006.

WILLE, C. N.; GOMES, C. B.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. **Horticultura Brasileira**, v. 37, p. 54-59, 2019.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S. Optimization of in vitro techniques for distinguishing between live and dead second stage juveniles of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0154818, 2016.