



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

**SÍNTESE E USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O  
CONTROLE DE *Pratylenchus brachyurus* NA CULTURA DA SOJA**

**LETICIA SANTANA DE OLIVEIRA**

**BRASÍLIA, DF  
2022**

**LETICIA SANTANA DE OLIVEIRA**

**SÍNTESE E USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O  
CONTROLE DE *Pratylenchus brachyurus* NA CULTURA DA SOJA**

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<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. Thais Ribeiro Santiago

**BRASÍLIA, DF  
2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

3048z	Santana de Oliveira, Leticia Síntese e uso de nanopartículas de prata para controle de Pratylenchus brachyurus na cultura da soja / Leticia Santana de Oliveira; orientador Thais Ribeiro Santiago. -- Brasília, 2022. 33 p.  Monografia (Graduação - Agronomia) -- Universidade de Brasília, 2022.  1. Nematóide das lesões. 2. Nanotecnologia. 3. Controle. 4. Cultura da soja. I. Ribeiro Santiago, Thais, orient. II. Título.
-------	---

### Cessão de direitos

Nome do Autor: Leticia Santana de Oliveira

Título: *Síntese e uso de nanopartículas de prata para controle de Pratylenchus brachyurus na cultura da soja*

Ano: 2022

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva - se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte deste relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

**LETICIA SANTANA DE OLIVEIRA**

**USO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA O CONTROLE DE  
*Pratylenchus brachyurus* NA CULTURA DA SOJA**

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.

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thaís Ribeiro Santiago  
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária –  
Universidade de Brasília  
Orientador

---

Msc. Francisco de Assis dos Santos Diniz  
Departamento de Fitopatologia– Universidade Federal de  
Viçosa  
Examinador

---

Dra. Cíntia Caetano Bonatto  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)  
Examinador

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família e amigos que me incentivaram durante esta caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por conceder auxílio em meio a essa caminhada, que foi vivenciada com saúde e plenitude. À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília pela oportunidade concedida para realização do Curso de Agronomia. Aos meus pais Rodrigo e Claudiana e minha família que me forneceram todos os recursos para que chegasse até aqui e ao meu cachorro Fred que esteve comigo em todos os momentos. Aos meus amigos que fizeram a rotina ser mais leve e descontraída. À professora e orientadora Thaís Ribeiro Santiago, que me proporcionou oportunidades e grandes momentos de aprendizado em nematologia no Departamento de Fitopatologia e Luciano Paulino da Silva que me acolheu no Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa. À doutoranda Thais França, que me auxiliou no desenvolvimento do trabalho e a todos os colegas do Laboratório de Epidemiologia da UnB que sempre se dispuseram a me ajudar.

**Muito obrigada!**

*Ser feliz é encontrar força no perdão,  
esperanças nas batalhas, segurança no  
palco do medo, amor nos desencontros. É  
agradecer a Deus a cada minuto pelo  
milagre da vida.*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

O nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.), mais especificamente *Pratylenchus brachyurus*, posiciona-se como uma das espécies mais importantes na cultura da soja, atrás somente dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) (LORDELLO, 1985; FERRAZ, 2016). O Brasil apresenta condições favoráveis para multiplicação desses fitoparasitas que estão distribuídos por todo país, levando a perdas de produtividade de até 50% (FRANCHINI et al.; 2014). Por ser uma espécie polífaga, seu controle é complexo, dificultando a obtenção de materiais resistentes e a rotação de culturas. Novas estratégias de controle devem ser desenvolvidas para diminuir perdas e prejuízos e aumentar a gama de opções dos produtores rurais. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo sintetizar e avaliar o efeito de nanopartículas de prata no ciclo de vida e morfologia de *P. brachyurus* na cultura da soja, avaliando sua eficiência no controle deste fitoparasita. Extratos de folhas de soja em diferentes concentrações foram utilizados como agentes redutores e estabilizantes para a síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs). A confirmação da formação das AgNPs foi realizada por curvas de absorbância realizadas em leitura espectrofotométrica UV-Vis entre 350-550 nm e inspeção visual das colorações das suspensões. As reações para síntese de AgNPs realizadas nas concentrações de 3,12 (3.12AgNP) e 6,25 (6.25AgNP) mg/mL do extrato vegetal apresentaram picos de máxima leitura entre 410 a 450 nm na análise espectroscópica de absorção na faixa UV-Vis e uma mudança da coloração nítida de amarelo claro para marrom após 2,5 h da mistura do extrato com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). Além disso, foi realizada caracterização das AgNPs sintetizadas utilizando os extratos aquosos nas concentrações com maior potencial para aplicação por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e sua atividade antimicrobiana foi avaliada *in vitro* e *in vivo* contra o fitonematoide *Pratylenchus brachyurus*. As AgNPs apresentaram tamanho nanométrico, forma arredondada, carga negativa e polidispersividade e estabilidade moderadas. A atividade inibitória do ensaio de funil de Baermann revelou uma alta atividade nematotóxica das AgNPs contra *P. brachyurus*. O experimento *in vivo* constatou diminuição considerável na quantidade final de nematóides nas raízes apesar de exibir fator de reprodução  $\text{FR} > 1$ . Com base nos resultados, as AgNPs

biossintetizadas a partir do extrato vegetal de soja representam um agente antibacteriano promissor para seu uso no controle do nematoide das lesões.

**Palavras-chave:** nematoide das lesões; nanotecnologia, controle.

## ABSTRACT

Soybean leaf extracts at different concentrations were used as reducing and stabilizing agents for the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs). The confirmation of AgNPs formation was performed by absorbance curves achieved in UV-Vis spectrophotometric reading between 350-550 nm and visual inspection of the suspension's colorations. The reactions for synthesis of AgNPs performed at concentrations of 3.12 (3.12AgNP) and 6.25 (6.25AgNP) of the plant extract showed peaks of maximum reading between 410 and 450 nm in the UV-Vis absorption spectroscopic analysis and a clear color change from light yellow to brown after 2.5 h of mixing the extract with silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). Furthermore, characterization of the synthesized AgNPs was accomplished using the aqueous extracts at the concentrations with the highest potential for application by dynamic light scattering (DLS) and their antimicrobial activity was evaluated *in vitro* and *in vivo* against the phytonematoid *Pratylenchus brachyurus*. The AgNPs presented nanometric size, negative charge and moderate polydispersity and stability. The inhibitory activity of Baermann funnel assay revealed a high nematotoxic activity of AgNPs against *P. brachyurus*. *In vivo* experiment found considerable decrease in the final number of nematodes in the roots despite exhibiting reproduction factor FR > 1. Based on the results, the biosynthesized AgNPs from soybean plant extract represent a promising antibacterial agent for their use in the control of the lesion nematode.

**Keywords:** root lesion nematode; green nanotechnology, control.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema de síntese verde de nanopartículas de prata.

**Figura 2.** Primeira síntese completa exibindo diferentes colorações para cada concentração, prata livre e extrato aquoso.

**Figura 3.** Prata livre ( $\text{AgNO}_3$ ) e nanopartículas de prata sintetizadas usando 3.12 e 6.25 mg/mL de extrato vegetal de folhas de soja, respectivamente.

**Figura 4.** Curvas de absorvância das nanopartículas de prata na concentração 3.12 (3AgNPs), extrato aquoso vegetal como controle (3E e 6E), 6.25 (6AgNPs) e prata livre obtidas por síntese verde com extrato de folhas de soja a 65°C por 2 horas.

**Figura 5.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas utilizando 3,12 mg/mL (A), 6,25 mg/mL (B) de extrato aquoso de folha de soja.

**Figura 6.** Espécime de *Pratylenchus brachyurus* identificado por microscopia de luz oriundo das amostras de campos de cultivo comercial de soja na cidade de Luziânia-GO.

**Figura 7.** Quatro diferentes concentrações (10, 25, 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) da nanopartícula de prata sintetizada com 6.25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNP) em contato com fêmeas de *P. brachyurus* em temperatura ambiente por 48h no Laboratório de Epidemiologia da Universidade de Brasília.

**Figura 8.** Abundância de nematoides após finalização do experimento *in vitro* em contato com nanopartículas de prata sintetizado com 6,25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNP) \* Diferença estatística com  $p > 0,05$ .

**Figura 9.** Imagem fotográfica das plantas durante o experimento *in vivo* para avaliação das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando 6,25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNP) depositadas diretamente em contato com as raízes de soja.

**Figura 10.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após os nematoides após 48h de exposição em solução das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando 6,25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNPs)

na concentração de 250  $\mu\text{M}$ . Região anterior, cutícula e corpo inteiro de *P. brachyurus* exposto 48 horas à AgNPs. (C e D) região anterior e cutícula de *P. brachyurus* sem exposição a nanopartículas.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta das AgNPs e prata livre.

**Tabela 2** - Resultado do experimento in vivo após 60 dias de contato das AgNPs com as raízes.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivos gerais .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 A cultura da soja .....	18
3.2 Valores econômicos .....	20
3.3 Problemas fitossanitários na cultura da soja .....	21
3.4 Os fitonematoides na cultura da soja .....	22
3.5 <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	24
3.6 Formas de controle de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	25
3.7 A nanotecnologia e sua aplicação.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Extrato de folhas de soja.....	29
4.2 Síntese e caracterização das nanopartículas .....	29
4.3 Identificação e multiplicação de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	30
4.4 Extração dos nematoides para multiplicação e montagem do experimento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1 Caracterização das AgNPs .....	32
.....	34
5.2 Identificação dos isolados de <i>P. brachyurus</i> e propriedades biológicas das AgNPs <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	36
5.3 Modo de ação das AgNPs sob os fitonematoides.....	39
6. CONCLUSÕES .....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## INTRODUÇÃO

Os nematoides fitoparasitas estão entre as principais pragas da agricultura mundial, causando perdas em torno de 80 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (JONES et al. 2013). De acordo com informativo anual da Sociedade Brasileira de Nematologia, estes organismos são responsáveis por perdas de aproximadamente R\$16,2 bilhões na produção de soja e estima-se que mais de 100 espécies de nematoides e cerca de 50 gêneros estão associados ao cultivo da oleaginosa. O nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.), mais especificamente *Pratylenchus brachyurus*, posiciona-se como uma das espécies mais importantes em termos de danos na cultura da soja, atrás somente dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) (LORDELLO, 1985; FERRAZ, 2016). O Brasil apresenta condições favoráveis para multiplicação desses fitoparasitas que se encontram distribuídos por todo país, levando a perdas de produtividade de até 50% (FRANCHINI et al.; 2014). Em alguns estados, como o Mato Grosso, *P. brachyurus* são encontrados em 96% das áreas cultivadas de soja (RIBEIRO et al., 2010).

O ciclo de vida de espécies de *P. brachyurus* é pontuado por seis estágios (ovos, quatro estágios juvenis e adultos). Com exceção de ovos e estágios J1, todos os estágios juvenis restantes e o adulto são vermiformes e móveis, permitindo a infecção das plantas hospedeiras. A invasão do tecido vegetal envolve tanto a força mecânica do estilete robusto quanto a secreção de um repertório de proteínas efectoras através do estilete. Consistente com outros nematoides parasitas de plantas, os nematoides das lesões radiculares produzem uma série de enzimas modificadoras da parede celular, que se acredita estarem envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro, na migração de nematoides ao longo do tecido radicular e modulação dos sistemas de defesa do hospedeiro (HAEGEMAN et al. 2011; NICOL et al. 2012; FOSU-NYARKO et al. 2015). Estes organismos não formam sítios de alimentação específicos (como por exemplo, as células gigantes ou os sincícios) e os mecanismos moleculares essenciais desse grupo de nematoides ainda são pouco compreendidos, sendo que estas características tornam o controle desses nematoides ainda mais difícil e conseqüentemente contribuírem para grandes perdas nas lavouras (CASTILLO and VOVLAS 2007; GOULART, 2008; VIEIRA et al. 2018). Dentre as formas de controle desse fitonematoide destaca-se o uso de nematicida e rotação de

cultura. No entanto, o uso repetido de nematicidas sintéticos vem causando preocupação devido à sua capacidade de conferir resistência ao patógeno, apresentar alto custo e contaminação do meio ambiente (CASTANEDA-ALVAREZ; ABALLAY, 2016). A rotação de culturas também pode ser dificultada pela ampla gama de hospedeiros de *P. brachyurus* (e.g. algodão, batata, feijão, fumo, milho, morango e tomate) (AMORIM, et al. 2018). Além da estratégia química e sucessão da soja com outras culturas não hospedeiras, existem outras formas de controle dentro do manejo integrado de pragas como: indução de resistência da planta com seleção de genótipos (ARAÚJO et al., 2015), tratamento de sementes e controle biológico utilizando extrato de algas, fungos e bactérias (ALMEIDA et al., 2016). No entanto, essas alternativas ainda são pouco estudadas e utilizadas. Apesar de serem medidas sustentáveis, não são capazes de controlar o patógeno eficientemente devido à sua agressividade e ao alto nível de infestação, portanto, é necessário que novas alternativas sejam pesquisadas para ampliar as opções ao produtor que sofre com constantes ataques de nematoides.

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar e ainda muito pouco estudada na área das ciências agrárias. A utilização das nanopartículas tem como vantagem a minimização do uso de insumos químicos e a diminuição de acúmulo de resíduos nocivos no solo e na água (DE-LUQUE e RUBIALES, 2009; SCHWABE, 2013). O crescimento sustentável da agricultura pode ser incrementado e acelerado pelas técnicas da nanotecnologia, principalmente quando se trata do uso de estruturas nanopartículas sintetizadas por meio de rotas verdes (MISHRA et al., 2014). As nanopartículas verdes possuem baixo custo de produção, podem ser produzidas em larga escala, além de terem maior estabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade ao meio ambiente (THAKKAR et al., 2010; MUKHERJEE e NETHI, 2019). A utilização das nanopartículas de prata (AgNPs) vem sendo empregada em uma variedade de aplicações devido ao seu amplo espectro antimicrobiano (MUKHERJEE e PATRA, 2017). Dentre os modos de ação das AgNPs destaca-se a inibição da respiração, alteração no funcionamento de enzimas e proteínas, replicação da célula por consequência das interações com o fósforo do DNA e interferência na permeabilidade da membrana plasmática (PRATHNA et al., 2011).

Existem inúmeros estudos mostrando a eficiência das AgNPs no controle de fitopatógenos como fungos, bactérias fitopatogênicas e um número reduzido de

trabalhos empregando o controle de fitonematoides. Recentes estudos reportam a eficiência das AgNPs para controlar principalmente as espécies do gênero *Meloidogyne*. Alguns dos mecanismos de supressão de densidade populacional observados para esse nematoide na presença da nanopartícula foram a inibição da eclosão de ovos, o bloqueio da entrada de J2 nas raízes e a interrupção no desenvolvimento dos juvenis dentro da raiz. Hassan et al. (2016) comprovaram a eficiência de AgNPs aplicadas sozinhas ou em conjunto com os nematicidas Fenamiphos e Oxamyl para controlar isolados de *M. incognita*. Após a aplicação das AgNPs, constatou-se mudanças morfológicas e paralisação dos juvenis, redução do número de galhas, menor volume da massa de ovos e nematoides no solo. Um estudo conduzido por Hamed et al. (2019) demonstrou que AgNPs sintetizadas a partir de cianobactérias foram eficientes na redução de ovos e provocou a mortalidade de juvenis de *M. javanica in vitro* e *in vivo*. Com resultado similar aos dois anteriores, AgNPs sintetizadas usando *Pseudomonas aeruginosa* reduziram a população de *Meloidogyne* spp. após exposição às nanopartículas nas concentrações de 200 e 250 µg/mL por 40 minutos. Além disso, houve uma redução do número de nematoides J2 no solo, no interior das raízes de tomate, no número de galhas e no número de massas de ovos por grama de raiz em relação ao controle (ABDELMONEIM e MASSOUD, 2016).

O agente redutor da síntese de nanopartículas também é um fator que influencia o efeito tóxico das AgNPs a fitonematoides (KALAISELVI et al., 2019). Dentre os agentes químicos redutores de sais metálicos encontrado em tecidos vegetais estão os aminoácidos, flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides, álcoois, aldeídos, aminas, compostos heterocíclicos, desidrogenases, proteínas de membrana, peptídeos, polissacarídeos e saponinas (MITTAL et al., 2013). Estes compostos também podem ser agentes estabilizantes que envolvem a superfície das partículas, restringindo crescimento e impedindo a agregação (INGALE, 2013). Dessa forma, a síntese, caracterização físico-química das nanopartículas metálicas e a avaliação desses compostos no ciclo de vida do nematoide vem sendo realizada com diferentes tecidos vegetais ou solução microbiana. Por exemplo, Moustafa et al. (2017) confirmam que AgNPs sintetizadas usando extrato de folhas de plantas medicinais *Conyza dioscoridis*, *Melia azedarach* e *Moringa oleifera* foram altamente eficazes contra a eclosão de ovos e estágio J2 de *M. incognita*, sendo os metabólitos

secundários presentes nas plantas contribuíram significativamente para o efeito nematicida. Sandeep e Biradarpatil (2018) e Abboud et al. (2016) confirmaram a síntese verde de AgNPs usando o extrato aquoso da semente e folha de soja como agente redutor e tamponador, respectivamente. Apesar de existirem estudos sobre a síntese verde a partir de estruturas da soja, ainda são escassos aqueles destinados à aplicação na agricultura e no controle de fitopatógenos. Além disso, o efeito antimicrobiano e mecanismos de ação de AgNPs são restritos ao gênero *Meloidogynes*, visto que nenhum trabalho foi realizado desafiando AgNPs sintetizadas usando rota verde para o controle de espécies de *Pratylenchus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Sintetizar e avaliar o efeito de nanopartículas de prata no ciclo de vida e morfológica de *P. brachyurus* na cultura da soja.

### 2.2 Objetivos específicos

- (1) Sintetizar e caracterizar AgNPs usando diferentes concentrações do extrato da folha de soja;
- (2) Avaliar a atividade antimicrobiana das AgNPs no controle de *P. brachyurus in vitro* e *in vivo*;
- (3) Observar o efeito das AgNPs nas alterações morfológicas de *P. brachyurus*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill é uma planta anual e herbácea, que pertence à família Fabaceae e à subfamília Papilionoideae. Oriunda do leste asiático, mais especificamente ao longo do Rio Yangtse na China, o material mais antigo dessa cultura encontra-se no herbário do imperador Shen Nung, Pents'ao Kong Mu, com datação de 2.300 a.C. A soja ancestral tinha como característica plantas rasteiras e sua exploração comercial aumentou com o cruzamento de plantas selvagens por pesquisadores da antiga China. Evidências históricas da domesticação ocorreram somente em torno do século 17 a.C. Após sua domesticação, a cultura se expandiu para vários países do oriente como Coreia, Japão e União Soviética, sendo considerada umas das plantas mais antigas cultivadas no mundo (PAIVA et al., 2006).

Após aproximadamente 5.000 anos, a soja começou a ser plantada no ocidente para fins comerciais, devido ao interesse da indústria pelo seu alto teor proteico e oleaginoso (CHUNG; SINGH, 2008). Um dos países do ocidente que iniciaram a comercialização da soja foram os Estados Unidos, primeiramente explorando essa cultura como forrageira. As cultivares introduzidas nos Estados Unidos foram oriundas do melhoramento genético da China, Coreia e Japão. Num momento posterior, geneticistas americanos obtiveram novas cultivares por meio do cruzamento de genótipos elite e obtiveram genótipos com melhores características de interesse agrônomo. Com relação ao Brasil, o primeiro cultivo de plantas de soja foi realizado por Gustavo D'Utra no estado da Bahia em 1882. Após sua introdução, o cultivo de soja não parou de crescer, tendo um aumento significativo na área plantada a partir da década de 40 (BONATO, 1987). A intensa comercialização dos grãos na sua recém implantação ocorre devido ao próprio incentivo do governo brasileiro com objetivo de aumentar a diversificação agrícola no país após uma crise no abastecimento agrícola (BONETTI, 1981). Esse incentivo do governo acarretou no aumento do interesse de produtores rurais no plantio da soja. Dentre os estados que se observou uma grande expansão da cultura foi o estado do Rio Grande do Sul, onde a cultura melhor se adaptou ao fotoperíodo em relação a outras regiões do país em um primeiro momento (MIYASAKA; MEDINA, 1977). A princípio, esses grãos produzidos eram principalmente utilizados na alimentação de aves e suínos na forma de farelo na década de 60. Entre a década 80-90, com o investimento e grupos de pesquisas

trabalhando com a cultura, a soja sofreu modificações genéticas passando a ser capaz de ser cultivada em regiões de baixas latitudes e solos com alto teor de alumínio começando a ser cultivada na região Centro-Oeste.

Atualmente, essa planta tem como característica o caule híspido pouco ramificado e raiz com eixo principal com ramificações. As folhas são do tipo trifolioladas, flores de fecundação autógama e produzem fruto do tipo vargens, onde é possível encontrar de uma a cinco sementes lisas, elípticas ou globosas com tegumento amarelo pálido (MÜLLER, 1981). Trata-se de uma planta com ciclo curto com média de 60 dias, e sob dias longos, ocorre um atraso no florescimento e alonga seu ciclo que dura em média 120 dias (TRENTIN et al., 2013). Além do fotoperíodo, o desenvolvimento e produtividade da cultura é influenciada pelas condições edafoclimáticas. A germinação e a emergência da semente da soja requerem a absorção de um volume de água de pelo menos 50% do seu peso seco, sendo necessário aproximadamente 450 a 800 mm de água para seu desenvolvimento (KRZYZANOWSKI et al., 1991). A temperatura ideal média do solo apropriada para semeadura está entre 20-30°C, sendo 25°C a ideal para uma emergência e uniformidade no desenvolvimento. Já para a maturação da planta, altas temperaturas e excesso de umidade podem diminuir a qualidade do grão, enquanto em condições de baixa umidade, os grãos tendem a sofrer danos mecânicos durante a colheita. A associação de temperaturas baixas na fase da colheita, acompanhadas ao período chuvoso, acarretam possível atraso na data da colheita, além de haste verde e retenção foliar (ADAMS, 1992; JIANG et al., 2004).

Além das condições edafoclimáticas ideais para o bom desenvolvimento e produtividade da soja, nutrientes são requeridos em quantidades asseguradas, variando de cultivar para cultivar ou local de plantio. Nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio e enxofre são considerados os nutrientes essenciais na cultura da soja (MARSCHNER, 1995). De acordo com Malavolta (2006), a deficiência de nitrogênio compromete significativamente o crescimento e florescimento da cultura; a deficiência de potássio resulta em baixa síntese de proteína e resistência a doenças; a falta de fósforo acarreta menor desenvolvimento vegetativo, produtividade, qualidade e senescência precoce; na falta de enxofre existe menor síntese de metionina e cistina; e com a deficiência de cálcio, raízes morrem e o crescimento conseqüentemente é afetado.

No entanto, a demanda nutricional varia com a fase de desenvolvimento da planta. No início de seu desenvolvimento, a soja apresenta uma baixa absorção de nutrientes, configurando seu maior nível de exigência quando chega em média, aos 30 dias até o enchimento de grãos que corresponde dos 39 aos 58 dias (CARMELLO; OLIVEIRA, 2006). Apesar de serem valores variáveis, pode-se estimar a exigência nutricional da soja com base na quantidade de nutrientes existentes nos restos da cultura e nos grãos para cada tonelada produzida.

### **3.2 Valores econômicos**

No mundo todo, a produção de soja foi de 362,947 milhões de toneladas, com 127,842 milhões de hectares de área plantada (USDA, 2021). O avanço científico transformou a história mundial dessa oleaginosa no Brasil com a expansão na área cultivada e a redução do custo na produção. Atualmente, o Brasil ocupa o primeiro lugar na produção de soja (USDA, 2022), registrando 135,409 milhões de toneladas do grão em uma área plantada de 38,502 milhões de hectares, totalizando uma produtividade de 3.517 kg/ha. A produção de soja do Brasil para o ano comercial 2021/22 é estimada em 125,0 milhões de toneladas (USDA, 2022) e de acordo com a estimativa feita pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de soja deve atingir 122,4 milhões de toneladas, uma redução de 11,4% em relação à safra anterior. As exportações brasileiras em janeiro de 2022 também ganharam destaque para o período do ano, em termos de receita e embarques. A soja em grãos registrou 2,45 milhões de toneladas em exportações, representando uma receita de US\$1,24 bilhões, maior valor já obtido para o mês de janeiro. Segundo boletim logístico da CONAB, a demanda mundial pela oleaginosa vem crescendo, devido à retomada da produção e do consumo de proteína animal no mundo todo. Além disso, nos últimos anos, a soja vem ganhando ainda mais espaço devido a sua rentabilidade assegurada, preços atrativos, variedades resistentes e alta demanda de mercado (JÚNIOR et al., 2017). Também segundo a CONAB, o Mato Grosso segue sendo o estado brasileiro de maior produção, tendo como produção 35,947 milhões de toneladas da oleaginosa por ano, em uma área plantada de 10,294 milhões de hectares, seguido por Rio Grande do Sul e Paraná. Para a safra 2022/2023, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) calcula que 395,37 milhões de toneladas de soja serão colhidas no mundo. Isso totaliza 680 mil toneladas a mais em comparação ao estimado no mês de maio de 2022. A China se mantém como a

maior consumidora, importadora do grão e a previsão é que o mercado chinês detenha 115,6 milhões de toneladas em 2022/2023.

### 3.3 Problemas fitossanitários na cultura da soja

Nos últimos anos, a pesquisa brasileira tem advertido a necessidade de aumento de produtividade, não somente para ocasionar uma lucratividade maior por hectare, mas também porque a disponibilidade de áreas começa a se estreitar e a população mundial aumentar. Dentre os principais fatores que acometem a redução na produtividade dessa cultura estão os problemas como as perdas causadas por dezenas de doenças e pragas que atacam a cultura, sendo as doenças um dos fatores maiores limitantes na obtenção de altas produtividades. Essas perdas continuam a aumentar com a expansão de novas áreas, o cultivo em monocultura em largas extensões e os plantios consecutivos da cultura na mesma área (Embrapa Soja, 2019).

A planta de soja está suscetível ao ataque de mais de 50 doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e nematoides (HENNING et al., 2014). As perdas anuais na produção por doenças estão em torno de 15 a 20%, sendo que algumas doenças podem acarretar perdas em 100% da produção (EMBRAPA, 2019). A intensidade e ocorrência das doenças depende do hospedeiro, do patógeno e do ambiente.

De fácil e rápida disseminação, as doenças fúngicas representam um grupo de grande relevância na Fitopatologia, entre elas, destaca-se a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) com maior destaque na produção de soja no Brasil. Entre outras doenças fúngicas de importância econômica destaca-se a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), crestamento foliar de cercospora e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*), oídio (*Microsphaera diffusa*) e mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (HENNING, 2014). As bactérias fitopatogênicas são capazes de se adaptar a condições climáticas adversas e apresentam sofisticados mecanismos de sobrevivência. Devido a isso, as doenças causadas por fitobactérias muitas vezes podem ser de difícil controle. O crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*), a pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), a mancha bacteriana marrom (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) e o fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) são as doenças bacterianas reportadas

na cultura da soja que causam maiores perdas econômicas (HENNING, 2014). Algumas viroses são esquecidas por ocorrer ocasionalmente em campos de cultivos e causar danos menores. O mosaico cálico (*Alfalfa Mosaic Virus*, AMV), o mosaico comum da soja (*Soybean Mosaic Virus*, SMV), a necrose da haste (*Cowpea Mild Mottle Virus*, CPMMV) são algumas das viroses de maior relevância, sendo elas transmitidas por meio de insetos vetores (HENNING, 2014). Tanto doenças de origem bacteriana, como viroses, ao infectar a planta hospedeira, não existe uma forma eficiente de controle.

### **3.4 Os fitonematoides na cultura da soja**

Os fitonematoides são parasitas obrigatórios, de formato variável, porém na sua maioria filiforme. Não possuem sistema respiratório e circulatório, sendo assim, realizam suas trocas gasosas por meio de difusão. São animais aquáticos que podem estar em diversos ambientes desde que haja umidade suficiente para sua sobrevivência (FERRAZ; BROWN, 2016). Seu tamanho microscópico, de 0,2 a 3,0 mm de comprimento, não permite que o produtor o veja a olho nu no campo, tornando ainda mais difícil a identificação e o manejo adequados deste parasita (FERRAZ; BROWN, 2016). De acordo com seus hábitos alimentares, os fitonematoides podem causar severos danos às plantas infectadas.

Inicialmente, com sintomas observados na parte aérea, em geral sintomas reflexos, lembram deficiências minerais. Em alguns casos, fitonematoides podem servir como vetores de vírus e como agentes causadores de ferimentos em plantas que servem como porta de entrada para fungos e bactérias (RUBIA, 2004). Esses organismos são capazes de manter-se ativo em condições extremas por meio de suas estratégias de sobrevivência como a anidrobiose e sobrevivendo em hospedeiros alternativos, portanto, de difícil eliminação, tendo como a melhor alternativa de controle evitar sua entrada desses patógenos na área. Em geral, os nematoides afetam diretamente o sistema radicular da planta, levando à alguns danos como a necrose e maceração dos tecidos, destruição e má formação de sementes, hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, interrupção do desenvolvimento do meristema apical de raízes, alterações fisiológicas na planta e da composição química da rizosfera e quebra de resistência da planta a patógenos (FERRAZ; BROWN, 2016).

Os nematoides adentram o tecido vegetal a partir da epiderme utilizando o estilete e vão se alimentando da planta e obtendo nutrientes a partir do citoplasma de células-vivas. Na fase inicial de alimentação, secreções das glândulas esofagianas são injetadas no citoplasma. Ao longo da fase de ingestão, os nutrientes disponíveis no citoplasma são sugados pelo estilete. Existem variações no processo alimentar, inclusive adaptações especializadas como a formação de sítios de alimentação e introdução do corpo e estilete (AMORIM et al., 2018; FERRAZ; BROWN, 2016). Os fitonematoides são classificados como endoparasitas quando adentram todo corpo no tecido da planta, semi-endoparasitas quando parte do corpo e ectoparasitas quando inserem apenas o estilete. Dentro destes grupos, podem ser agrupados como migratórios e sedentários quando ocorre ou não a movimentação dos espécimes no tecido hospedeiro, respectivamente (AMORIM, et al. 2018).

De acordo com a Embrapa, cem espécies de fitonematoides, de 50 gêneros, foram reportadas na cultura da soja. Dentre os gêneros com ampla distribuição no maior e que causam maiores danos destaca-se o nematoide do cisto (*Heterodera glycines*), nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.), o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) e o nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*). *H. glycines* foi constatado pela primeira vez no Brasil na safra 1991/92 (LORDELLO et al., 1992). Dependendo da população do nematoide presente no solo, as perdas podem atingir 100% da produção. Formam cistos que são o corpo da fêmea adulta morta, que contém cerca de 500 ovos cada (TAYLOR, 1971). Os sintomas em campo se caracterizam pela presença de reboleiras, com folhas cloróticas e atrofiadas e em casos mais graves, morte precoce das plantas e ausência de raízes secundárias. *R. reniformis* são de difícil controle, especialmente porque as espécies de soja que apresentam resistência não conferem características agronômicas favoráveis como a resistência a glifosato, alta produtividade e precocidade (EMBRAPA, 2010). Como sendo o mais importante fitonematoide descrito, *Meloidogynes* spp. possuem extensa gama de hospedeiros e causam hipertrofia e hiperplasia nos tecidos das raízes dando origem às galhas, que deixam o sistema radicular deficiente e assim, prejudica toda a planta.

### 3.5 *Pratylenchus brachyurus*

Na cultura da soja, o terceiro grupo mais importante de nematoides fitoparasitas é do gênero *Pratylenchus*. Pertencente ao Filo Nematoda e a família Pratylenchidae, estes nematoides foram descritos pela primeira vez no ano de 1929, em raízes coletadas de abacaxi, em Kipapa, Havaí, EUA (GODFREY, 1929).

Nematoides do gênero *Pratylenchus* são endoparasitas migratórios de aproximadamente 0,9 mm de comprimento e formato vermiforme. Seu ciclo de vida é definido pelo ovo, estádios juvenis (J1 a J4) até a fase adulta. A ovoposição é feita no interior das raízes e, em geral, são depositados de 70 a 120 ovos. A duração do ciclo de vida varia de acordo com características do ambiente, sendo de três a seis semanas o período de ovo a ovo (FERRAZ, 2006). A temperatura ideal para reprodução destes fitopatógenos está na faixa de temperaturas altas (26,7 – 32,2°C) e para a postura de ovos 35°C, que são depositos sobre os tecidos das raízes de forma isolada (ROMAN; HIRSCHMANN, 1969). Os juvenis e adultos são capazes de atacar as raízes e deslocar-se repetidamente para dentro e fora dos tecidos, através do córtex ou do tecido parenquimático em direção ao cilindro central, envolvendo ação mecânica e enzimática (LINDSEY; CAIRNS, 1971; FERRAZ; BROWN, 2016). Em todo o mundo, encontram-se oitenta espécies do gênero *Pratylenchus*. Dentre as espécies com maior importância no Brasil estão: *P. brachyurus*, *P. penetrans*, *P. vulvus* e *P. zae* (FERRAZ; BROWN 2016). *P. brachyurus*, também conhecido como o nematoide das lesões, destaca-se como ampla distribuição e gama de hospedeiros incluindo espécies de importância econômica como feijão, algodão, batata, milho e, a cultura desse estudo, a soja Machos de *P. brachyurus* são difíceis de serem encontrados, devido à forma de reprodução das fêmeas por meio da partenogênese mitótica, sem necessidade de machos para cópula, pois ao longo da oogênese não se verifica sinapse, fazendo com que só uma divisão mitótica ocorra nos oócitos e o óvulo mantenha a situação diplóide sem que precise da colaboração do espermatozoide.

A ampliação da soja em áreas de solos arenosos e temperaturas ótimas concordada ao plantio de cultivares suscetíveis e à semeadura de plantas hospedeiras como o milho e o algodão, na entressafra da soja, indisponibilidade de cultivares resistentes e inviabilidade de uso de nematicidas são as principais causas de

epidemias por estes nematoides (DIAS et al., 2010). Sua patogenicidade é totalmente influenciada pelas características edafoclimáticas da região e pelo teor de nutrição da planta. Quanto mais nutrida uma planta estiver, mais ela terá tolerância e defesas ativas contra o ataque do patógeno, conseqüentemente influenciando seus níveis de reprodução (AMORIM et al., 2018)

### **3.6 Formas de controle de *Pratylenchus brachyurus***

Algumas formas de controle já adotadas para *P. brachyurus* envolvem a redução de seus níveis populacionais e o estímulo do desenvolvimento radicular. De acordo com Rodríguez-Kábana e Canullo (1992), o uso de adubação de cobertura, tratamento de semente, aplicação de inimigos naturais como bactérias e fungos, pousio, plantas armadilhas, maus hospedeiros e plantas que possuem substâncias com efeito nematicida em seus tecidos apresentam-se eficientes, além do método de alqueive detalhado por Inomoto (2008) (HENNING, 2005). Porém, a primeira medida de controle é impedir a entrada nas áreas de cultivo, tomando-se atenção quanto a procedência de equipamentos, máquinas e ferramentas. Todas devem passar por inspeção e serem corretamente higienizadas.

A ampla gama de hospedeiros de *P. brachyurus* dificulta a seleção de espécies vegetais para a composição de esquemas de rotação ou sucessão. A eficiência de produtos químicos como os nematicidas Carbofuran, Albicarb, Fenamifos ou Oxamil tem se apresentado instabilidade (INOMOTO et al., 2009), além de todos os malefícios que são capazes de causar ao homem, animais e a natureza. O estudo sobre plantas geneticamente modificadas ainda é recente e caro, fazendo com que o produtor fique cada vez mais dependente de novas tecnologias e estudos acerca de métodos de controle mais eficientes. Especialmente *P. brachyurus*, que apesar de ser extremamente importante economicamente, ainda é negligenciado na área de estudos científicos requerendo maior atenção quanto à sua forma de controle e manejo, que se tornam cada vez mais ineficientes com o passar dos anos devido à indução de resistência e aumento de populações.

À frente destes obstáculos, providências alternativas tornam-se fundamentais para busca do controle destes nematoides fitopatogênicos. A nanotecnologia pode ser uma possibilidade viável para o manejo destes parasitas. As aplicações

nanotecnológicas compreendem as mais variadas áreas, como na medicina, farmácia, indústria alimentícia e têxtil, biorremediação, entre outros (KUMARI; YADAV, 2009; THIRUMURUGAN; DHANARAJU, 2011; INGALE, 2013). Deste modo, a competência de aplicabilidade dos sistemas nanoestruturados é muito variado e pouco estudado para o controle de doenças de plantas.

### **3.7 A nanotecnologia e sua aplicação**

Os sistemas nanoestruturados possuem tamanho em nanoescala, com dimensões entre 1 a 100 nanômetros - medida que equivale à bilionésima parte do metro. A nanotecnologia vem sendo um dos principais focos de estudo e pesquisa no mundo nos últimos anos, abrindo portas para soluções em campos multidisciplinares de estudo, inclusive na agricultura, que envolve o desenvolvimento de nanoformulações de agroquímicos para proteção da cultura, identificação de toxicidade por meio de biossensores, manipulação genética por meio de nanodispositivos e diagnose de doenças de plantas. Já é uma realidade o uso de nanofios, nanofiltros e materiais nanofibrosos para resistência à patógenos de plantas (SARANYA et al., 2019), além de nanofertilizantes, nanopesticidas e biorremediação em solos contaminados (MUHAMMAD et al., 2020).

A síntese de nanopartículas (NPs) pode ser feita seguindo técnicas de *Top-down* que consiste em levar estruturas maiores à nanoescala e *Bottom-up* em que moléculas e átomos individuais se organizam para também formar estruturas em nanoescala. Geralmente, a maioria das técnicas físico-químicas utilizadas na síntese de NPs incluem solventes tóxicos e a formação de resíduos nocivos à saúde humana, animal e ao meio ambiente, fazendo com que a inserção das NPs nos mais diversos campos fique restrita (SALAM et al., 2012; CAUERHFF e CASTRO, 2013). Nesta situação, levanta-se grande interesse na busca por rotas alternativas de síntese mais seguras e com menor efeito negativo ao meio ambiente e, dentre elas, a síntese verde é promissora. A síntese verde de NPs propõe o aproveitamento de organismos biológicos, ou partes deles, como órgãos, tecidos, células ou biomoléculas, como substitutos de reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese de NPs (IRAVANI, 2011). Essa rota de síntese tem uso de solventes de toxicidade baixa a nula, os quais levam a um impacto ambiental baixo, porém, maiores estudos acerca dos impactos a longo prazo que as nanopartículas de prata podem causar devem ser investigados.

Ademais, as NPs sintetizadas por essas rotas evidenciam biocompatibilidade e biodegradabilidade. O custo de produção é relativamente baixo e obtém-se um grande rendimento. Plantas podem atuar como agentes químicos redutores de sais metálicos e como agentes estabilizantes das NPs, revestindo a superfície das partículas, encurtando o seu crescimento e dificultando que se agrupem (INGALE, 2013). Nanopartículas de prata (AgNPs) vêm sendo comumente utilizadas devido às suas propriedades antimicrobiana e maior área de superfície (DORIA et al., 2012). Dentre o modo de ação já caracterizado pelas AgNPs destaca-se a inibição da respiração, a alteração no funcionamento de enzimas/proteínas e a interferência negativa da replicação celular devido à interação da nanopartícula com o fósforo do DNA (PRATHNA et al. 2011).

A caracterização estrutural e físico-química das NPs é feita por meio de equipamento de espalhamento de luz dinâmica (DLS), espectrofotômetro e Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Por meio do DLS é possível obter dados de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (Pdl) e determinação de carga de superfície (potencial Zeta). É preferível que as NPs não ultrapassem a medida de 100nm e que seu índice de polidispersividade esteja próximo de 0, o que indica que maior monodispersividade e menor heterogeneidade. O valor do potencial Zeta varia em módulo, que potencializa uma maior repulsão eletrostática e, conseqüentemente uma menor tendência a agregação e sedimentação entre as partículas quando os valores são altos. (SILVA et al 2017). Kalaiselvi et al (2017) demonstraram a efetividade de AgNPs sintetizadas usando extrato de duas plantas tropicais (*Azadirachta indica* e *Curcuma longa*) contra os nematoides do gênero *Meloidogyne*. Após exposição das AgNPs sintetizada utilizando diferentes concentração de extrato de *A. indica* (1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 7 mg/L and 10 mg/L) e *C. longa* (0,01 mg/L, 0,03 mg/L, 0,05 mg/L e 0,07 mg/L) por 24, 48 e 72 horas, notou-se que os 200 juvenis de segundo estágio recém-eclodidos apresentaram grande índice de mortalidade. A concentração letal de AgNPs utilizando *A. indica* gira em torno de 6.22 mg/L e 0.54 mg/L para *C. longa* após 72 h. Assim, o índice de letalidade foi maior quando os nematoides foram expostos às NPs sintetizadas com *C. longa*. El-Deen e El-Deeb (2018) utilizaram da mesma rota de síntese verde para AgNPs utilizando gengibre (*Zingiber officinale*) como precursor para redução das nanopartículas contra a infecção de *M. incognita* em tomate. Após tratamento de solo

com as AgNPs em concentrações de 1,0, 0,50 e 0,25 mM, notou-se maior crescimento das plantas, apresentando poucas ou até mesmo nenhuma galha, além do número de massa de ovos ter sido reduzido significativamente. Não se observou diferença estatística entre as concentrações utilizadas. Khan et al (2021) também comprovou eficiência de AgNPs na inibição de eclosão de ovos de *M. incognita* após ficarem em contato por 48 horas. O uso de AgNPs no controle de *P. brachyurus* ainda se mostra um desafio tendo em vista que são organismos de maior complexidade, uma vez que não formam nenhum tipo de célula de alimentação especializada e grande parte dos estudos anteriores se voltam para o gênero *Meloidogyne spp.* É necessário compreender se o controle de *P. brachyurus* por meio de AgNPs é viável e eficiente, além de entender os mecanismos de ação destas nanopartículas nas estruturas deste nematoide.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Extrato de folhas de soja

Plantas sadias de soja foram mantidas na casa-de-vegetação da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Distrito Federal, Brasil, por 80 dias. As folhas das plantas foram cortadas, lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água destilada em abundância. Após as folhas secarem em temperatura ambiente, essas foram guardadas em um saco plástico e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a preparação do extrato, dois gramas de folha foram cortados e adicionados a 20 mL de água ultrapura em estado de ebulição por dois minutos. O extrato foi filtrado através do papel filtro Qualy nº 7 ( $14\ \mu\text{m}$ ) (Qualy Comercial Eireli, Passos, MG, Brasil) com auxílio de um funil. Posteriormente, o extrato aquoso, de coloração verde clara, das folhas filtrado foi usado para síntese de AgNPs.

### 4.2 Síntese e caracterização das nanopartículas

A síntese verde de AgNPs foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para a síntese verde das nanopartículas de prata, nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi usado como o metal precursor em solução aquosa na concentração final de 2 mM após a diluição. A síntese das nanopartículas foi realizada variando as concentrações de extrato vegetal de 3,12 e 6,25 mg/mL, nomeadas como 3.12AgNP e 6.25AgNP, respectivamente, pois foram as que obtiveram melhor resultado em sínteses anteriores, apresentando melhor formação de nanopartículas, melhor diâmetro hidrodinâmico e melhor estabilidade coloidal. Uma síntese prévia foi realizada para definir as melhores concentrações de extrato vegetal. O teste foi conduzido utilizando concentrações de 0,39; 0,78; 3,12; 6,25; 25 e 50 mg/mL (Figura 2).

Foi feita a diluição do extrato aquoso estoque nas concentrações mencionadas e seus respectivos controles, deixando em banho maria por 2,5 h a  $65^{\circ}\text{C}$ . Cada amostra foi colocada em tubo Falcon devidamente identificado, e protegido com papel alumínio para evitar incidência luminosa, e em sequência foi bem vedado para evitar qualquer tipo de vazamento. As AgNPs foram armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior caracterização e realização dos testes de atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. A formação de AgNPs

foi avaliada em termos de mudança de absorvância no comprimento de onda entre 350 - 550 nm em espectrofotômetro UV-Vis. A avaliação das AgNPs foi realizada em triplicata e a metodologia de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas, distribuição das populações de tamanho das partículas pelo índice de polidispersividade (PDI) e mobilidade eletroforética para determinar o potencial Zeta. Para avaliação da morfologia das AgNPs utilizou-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em equipamento JEM-1011 (Jeol, Tóquio, Japão) localizado no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília com uma tensão de trabalho de 100 kv, e para investigar a ação e deposição das AgNPs nos fitonematoides foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

#### **4.3 Identificação e multiplicação de *Pratylenchus brachyurus***

Para obtenção de isolados de *P. brachyurus*, plantas de soja com sintomas da doença foram coletadas no município de Luziânia (16°20'17" S 47°44'29" O) em áreas com histórico da doença no mês de maio de 2019. Para extração dos nematoides, seguiu-se o método de Coolen & D'Herde (1972). Com o auxílio de uma lupa, dez fêmeas adultas foram pescadas da solução e preservadas em solução Golden X, conforme Hooper (1970) para a identificação morfológica a nível de espécie. A identificação dos nematoides foi realizada por meio de microscopia de luz, observando estruturas específicas do gênero *P. brachyurus* (Figura 6). Concomitantemente, uma pequena quantidade da solução contendo os fitonematoides foi centrifugada por cinco minutos em uma rotação de 3500 rpm e, posteriormente, adicionada uma solução de sacarose na concentração de 50% por 2 minutos por 1500 rpm. Após a centrifugação, o excesso de água foi retirado e adicionou-se 50 mL de água destilada contendo ampicilina na concentração de 0,05 g/mL por 40 minutos. Ao final do procedimento, 750 fêmeas do gênero *Pratylenchus* foram pescadas com auxílio de uma agulha de acupuntura e adicionadas em um tubo de ensaio contendo uma solução de antibiótico na mesma concentração de 0,05 g/mL.

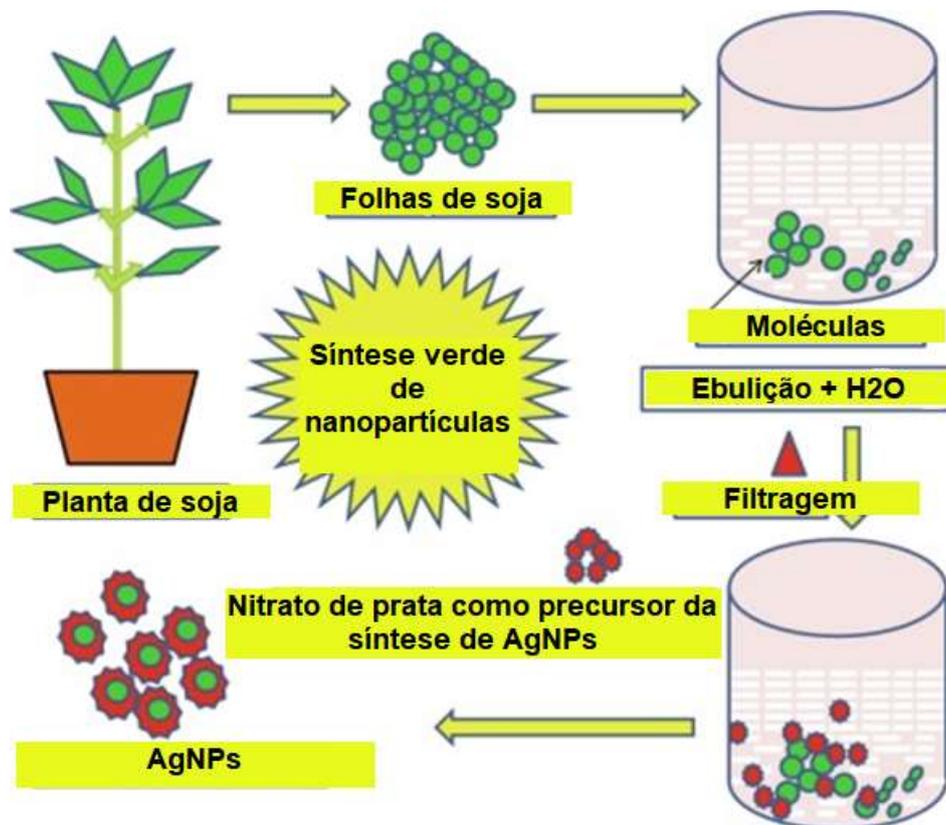
Preparou-se também cilindros de cenoura (*Daucus carota* L.) para a multiplicação dos fitonematoides. Os cilindros foram cortados e preparados pela técnica de Moody et al. (1973), com modificações de acordo como foi descrito por Gonzaga et al. (2006). Na câmara de fluxo laminar, as cenouras foram mergulhadas

em álcool etílico absoluto P. A e tiveram seus cilindros centrais cortados com ajuda de um perfurador de metal. Todos os utensílios foram previamente flambados antes de entrar em contato com o material. Os cilindros centrais retirados das cenouras foram colocados em potes de acrílico devidamente autoclavados. Os potes foram deixados por cinco dias a 28°C no escuro para acompanhar possíveis contaminações. Uma vez que os cilindros não tenham indício de contaminação, realizou-se a inoculação dos nematoides axenizados no cilindro de cenoura. No total, 25 foram inoculadas 25 fêmeas de nematoides extraídos em fragmentos de cenouras e depois mantidas em B.O.D em temperatura adequada para multiplicação e reprodução (25°C) dos fitonematoides durante dois meses no Laboratório de Epidemiologia e Controle do Departamento de Fitopatologia da UnB. Além do método das cenouras (MOODY et al. 1973) a multiplicação também foi realizada em plantas de soja em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia.

#### **4.4 Extração dos nematoides para multiplicação e montagem do experimento *in vitro* e *in vivo***

Para a realização dos testes *in vitro*, *P. brachyurus* foram extraídos da raiz de soja cultivada em casa-de-vegetação utilizando a metodologia de Coolen e D'Herde (1972) e os nematoides foram contados utilizando Câmara de Peters. A metodologia consiste em separar o solo das raízes, que são lavadas e cortadas em 1 centímetro de comprimento e trituradas no liquidificador por 1 minuto, imersas em água da torneira. A suspensão é vertida sobre um conjunto de peneiras de 45 mesh sobreposta a outra de 150 e 500 mesh respectivamente. Na peneira de 45 mesh ficarão retidas todas as impurezas e partículas maiores, que devem ser descartadas. A suspensão retida na peneira de 500 mesh deve ser recolhida em tubo de centrífuga com auxílio de pisseta com água pois é esperado que os nematoides estejam nela retidos. Posteriormente, aproximadamente 820 nematoides foram imersos em uma solução contendo diferentes concentrações (10, 25, 100 e 250 µM) de AgNPs (6.25AgNP) por 48 horas a temperatura ambiente. Após esse período de incubação, os nematoides contidos na solução foram adicionados em funil de Baermann para a contagem de indivíduos de *P. brachyurus* vivos que desceram pelo funil. O experimento foi repetido em triplicata em um delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram realizadas no software R por meio do método equivalente Kruskal-Wallis.

O estudo *in vivo* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. As plantas de soja foram inoculadas com 1000 nematoides no estágio fenológico V1, que acontece duas semanas após a semeadura. Três dias após a inoculação, 6.25AgNP (100 e 250  $\mu\text{M}$ ) foi aplicada na rizosfera da planta. Após 60 dias, os aspectos da parte aérea, das raízes e o fator de reprodução (FR) dos nematoides foram analisados usando ANOVA e o teste de Scott Knot ( $P \leq 0,05$ ). Plantas sem aplicação de NPs e sem nematoide foram utilizadas como controle.



**Figura 1.** Esquema de síntese verde de nanopartículas de prata.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das AgNPs

A formação das AgNPs foi indicada visualmente pela mudança na coloração das suspensões amareladas para amarronzadas e por meio da formação de picos no

comprimento de onda ~ 425 nm por espectrofotometria (Figuras 2, 3, 4). De fato, estes métodos são os mais utilizados para monitorar o sucesso da formação de AgNPs. As propriedades ópticas estão diretamente relacionadas com o efeito de ressonância plasmônica de superfície (RPS), o qual é altamente dependente da forma e tamanho dos AgNPs (AMENDOLA et al. 2010). Os controles negativos do experimento, água ultrapura e os extratos vegetais, não deram qualquer indício da formação de estruturas em função do efeito de RPS e conseqüentemente não formaram AgNPs. Como foi possível observar diferenças no RPS das NPs, esperava-se encontrar diferenças no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas com diferente concentração do extrato vegetal. De fato, o extrato vegetal nas concentrações de 3,12 e 6,25 mg/mL usados como precursores para a formação das nanopartículas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos diferentes. Observou-se um diâmetro hidrodinâmico de 104,4 e 73,5 nm para as nanopartículas de 3.12AgNP e 6.25AgNP, respectivamente. Assim, demonstrou-se a capacidade do extrato vegetal obtidos a partir de folhas de soja na produção de AgNPs.

Para uma melhor caracterização do tamanho e forma das nanopartículas sintetizadas, foi utilizada a técnica de MET, que demonstrou AgNPs de formato variando de esféricas a cúbicas, leve formação de aglomerados e com moderada variação de tamanho (Figura 5).

Como também demonstrado por DLS, as suspensões de AgNPs apresentaram tamanho polidisperso com valores de Pdl próximos a 0,2, sendo considerado um valor aceitável e resultados similares foram observados para as 6.25AgNPs (0,22) e 3.12AgNPs (0,23) (Tabela 1). Em geral, o valor encontrado em Pdl não foi diferente do observado na literatura quando se realiza a síntese de nanopartículas de prata por meio de rotas verdes (MURDOCK et al. 2008). Com relação ao potencial Zeta, as AgNPs tiveram um valor negativo que variou de -23,3 a -25,1 mV (Tabela 1). Baseado nesses valores, considera-se que as partículas tenham moderada estabilidade coloidal, uma vez que apresentam repulsão eletrostática mútua suficiente para assegurar a estabilidade da suspensão, sendo essa característica interessante para aplicação deste produto em campo. Como só foi realizada a síntese de AgNPs utilizando apenas em duas concentrações de extrato vegetal de folha de soja é difícil

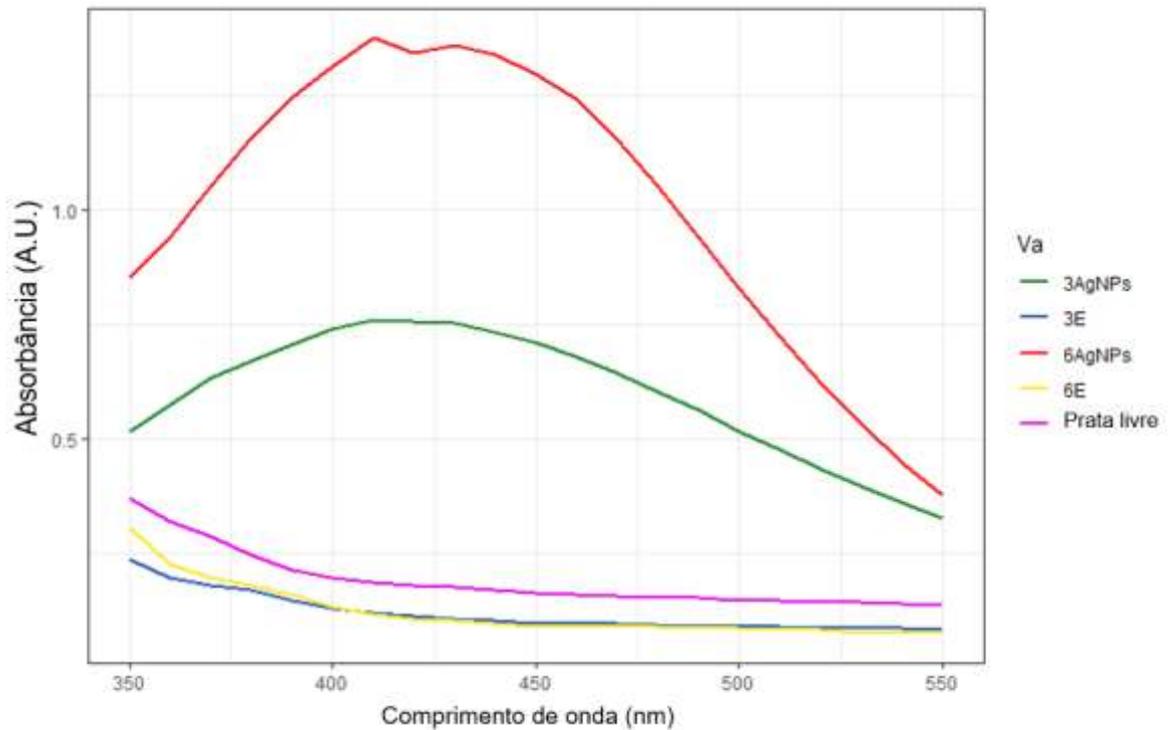
extrapolar a correlação com o aumento ou diminuição do tamanho, Pdl e potencial Zeta com o aumento da concentração do extrato.



**Figura 2.** Primeira síntese completa exibindo diferentes colorações para cada concentração, prata livre e extrato aquoso.



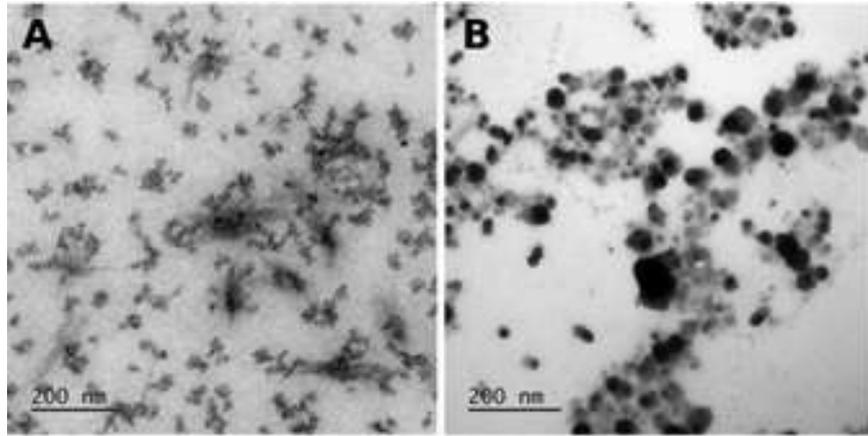
**Figura 3.** Prata livre ( $\text{AgNO}_3$ ) e nanopartículas de prata sintetizadas usando 3.12 e 6.25 mg/mL de extrato vegetal de folhas de soja, respectivamente.



**Figura 4.** Curvas de absorvância das nanopartículas de prata na concentração 3.12 (3AgNPs), extrato aquoso vegetal como controle (3E e 6E), 6.25 (6AgNPs) e prata livre obtidas por síntese verde com extrato de folhas de soja a 65°C por 2 horas.

**Tabela 1.** Característica físico-química das nanopartículas de prata sintetizadas com 3.12 (3.12AgNP) e 6.25 (6.25AgNP) mg/mL de extrato de folha de soja obtidas por espalhamento de luz dinâmico para obtenção do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta.

Nanopartículas	Tamanho (d.nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
Ag <sup>+</sup>	674,0	0,575	-19,1
3.12AgNP	104,3	0,237	-25,1
6.25AgNP	73,5	0,229	-23,3



**Figura 5.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas utilizando 3,12 mg/mL (A), 6,25 mg/mL (B) de extrato aquoso de folha de soja.

## **5.2 Identificação dos isolados de *P. brachyurus* e propriedade biológicas das AgNPs *in vitro* e *in vivo***

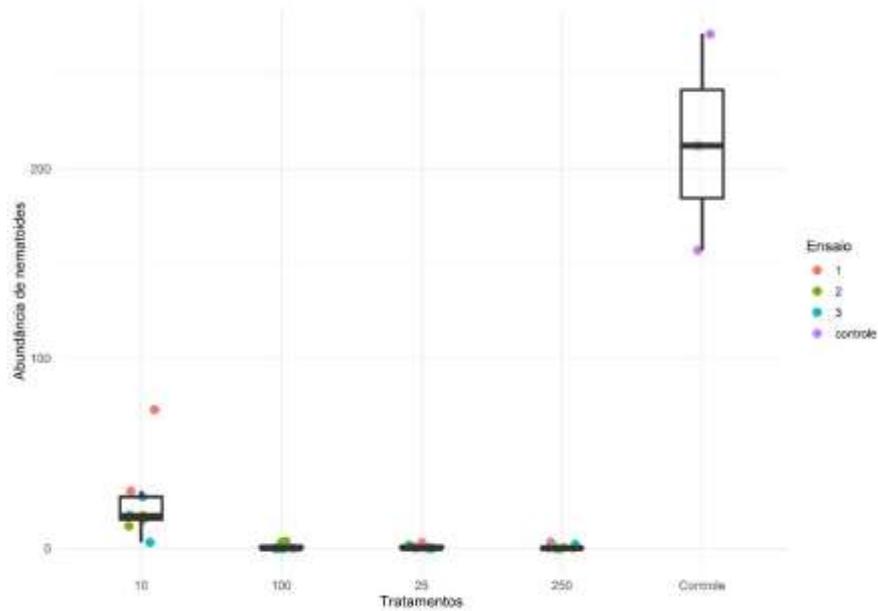
Os isolados de *P. brachyurus* foram identificados por meio de microscopia de luz, observando características específicas como posição da vulva mais na parte posterior do corpo e formato do estilete (Figura 6). As 6.25AgNPs foram escolhidas para realização do teste *in vitro* por terem apresentado menor diâmetro hidrodinâmico. Para a avaliação da atividade nematicida das nanopartículas em contato com os nematoides, contou-se os nematoides que passaram pelo funil de Baermann (Figura 5 e 6). Como não houve normalidade dos dados obtidos, utilizou-se o método estatístico de Kruskal-Wallis e para a comparação dos grupos utilizou-se o teste pairwise.wilcox.s. Uma redução significativa foi observada na contagem dos fitonematoides que estavam em contato com as nanopartículas (10-250 µg/mL) e passaram pelo funil comparado aos que estavam em contato com água (p-value = 1,52)). As concentrações de 25 µg/mL, 100 µg/mL e 250 µg/mL se diferenciam apenas do controle e 10 µg/mL se diferencia de todos, tornando 25 µg/mL a concentração mais viável. (Figura 7 e 8). Resultados similares foram observados quando AgNPs sintetizadas utilizando *Pseudomonas aeruginosa* aumentaram a mortalidade da população de *Meloidogyne* spp. após exposição a AgNPs nas concentrações de 200 e 250 µg/mL por 40 min (ALMAGHRABI et al., 2013). A aplicação *in vitro* das AgNPs nas raízes das plantas reduziu o FR em 64-65% (Figura 7).



**Figura 6.** Espécime de *Pratylenchus brachyurus* identificado por microscopia de luz oriundo das amostras de campos de cultivo comercial de soja na cidade de Luziânia-GO.



**Figura 7.** Quatro diferentes concentrações (10, 25, 100 e 250 µg/mL) da nanopartícula de prata sintetizada com 6.25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNP) em contato com fêmeas de *P. brachyurus* em temperatura ambiente por 48h no Laboratório de Epidemiologia da Universidade de Brasília.



**Figura 8.** Abundância de nematoides após finalização do experimento *in vitro* em contato com nanopartículas de prata sintetizado com 6,25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNP) \* Diferença estatística com  $p > 0,05$ .

A quantidade de nematoides nas raízes após o período do experimento foi reduzida consideravelmente quando comparada com as plantas sem nanopartículas, apesar do fator de reprodução ter sido maior que um, o que pode ser atribuído a cultivar de soja plantada. O coeficiente de variação experimental (CV%) indicou boa precisão experimental.

**Tabela 2.** Resultado do experimento *in vivo* após 60 dias de contato das AgNPs com as raízes, sendo T1 com AgNPs 100  $\mu\text{M}$ , T2 AgNPs 250  $\mu\text{M}$ , T3 plantas com nematoides sem nanopartículas e T4 plantas sem nematoides.

Trat	Altura	PPA	Nº folhas	PR	T nema	N/g raiz	FR
T1	62,79 <sup>a</sup>	27,57 <sup>a</sup>	19,00 <sup>a</sup>	10,71 <sup>a</sup>	1592,38 <sup>b</sup>	190,48 <sup>b</sup>	1,59 <sup>b</sup>
T2	58,79 <sup>a</sup>	24,57 <sup>a</sup>	19,29 <sup>a</sup>	8,71 <sup>a</sup>	1674,40 <sup>b</sup>	215,81 <sup>b</sup>	1,67 <sup>b</sup>
T3	61,71 <sup>a</sup>	30,00 <sup>a</sup>	21,00 <sup>a</sup>	11,71 <sup>a</sup>	4596,66 <sup>c</sup>	457,92 <sup>b</sup>	4,6 <sup>c</sup>
T4	64,98 <sup>a</sup>	28,50 <sup>a</sup>	16,50 <sup>a</sup>	11,75 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>

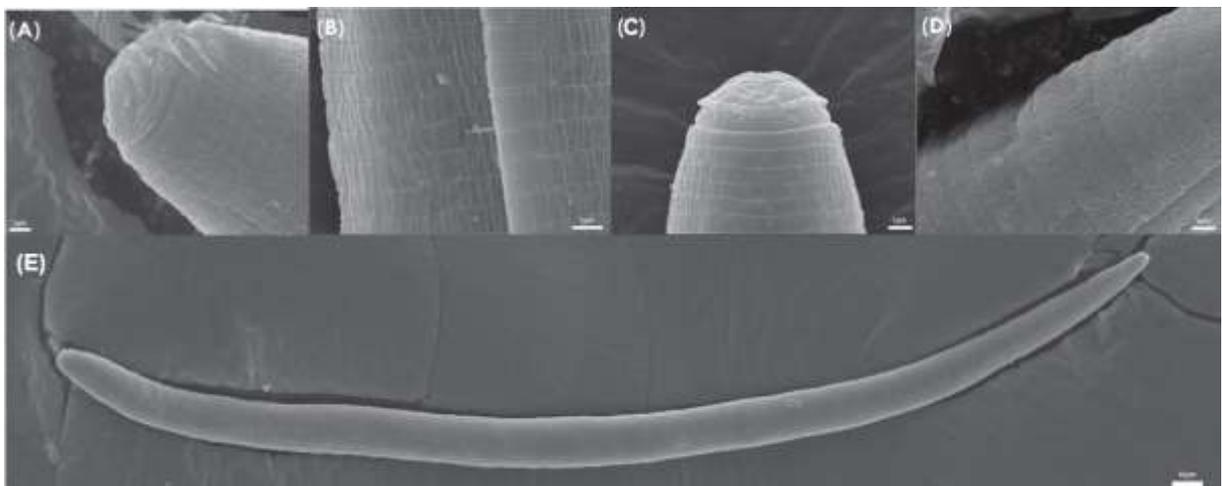
CV (%)	10,58	26,61	16,51	37,34	49,56	58,58	38,44
--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------



**Figura 9.** Imagem fotográfica das plantas durante o experimento *in vivo* para avaliação das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando 6,25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNP) depositadas diretamente em contato com as raízes de soja.

### 5.3 Modo de ação das AgNPs sob os fitonematoides

Pela observação das imagens em MEV, acredita-se que as AgNPs se depositam inicialmente na cutícula dos nematoides. No entanto, não foi possível identificar alteração na cutícula pelo período em que ficou submetido a ação de AgNPs. Acredita-se que as AgNPs entrem no corpo do nematoide pelo estilete.



**Figura 10.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após os nematoides após 48h de exposição em solução das nanopartículas de prata sintetizadas utilizando 6,25 mg/mL de extrato aquoso de folha de soja (6.25AgNPs) na concentração de 250  $\mu$ M. Região anterior, cutícula e corpo inteiro de *P. brachyurus* exposto 48 horas à AgNPs. (C e D) região anterior e cutícula de *P. brachyurus* sem exposição a nanopartículas.

## 6. CONCLUSÕES

Demonstrou-se que extratos aquosos de folhas de soja foram eficientes para a síntese de AgNPs quando utilizadas nas concentrações de 3,12 e 6,25 mg/mL. Os diâmetros hidrodinâmicos dessas nanoestruturas estiveram de acordo com o esperado (<100 nm), formato esférico e apresentaram polidispersividade moderada. Pode-se observar a eficiência das 6,25AgNPs na ação nematicida a *P. brachyurus* nas concentrações testadas de 25, 100 e 250  $\mu$ M, porém, é preferível utilizar a concentração de 25  $\mu$ M por demonstrar a mesma eficácia que concentrações mais elevadas.

Na avaliação *in vivo*, foi possível perceber boa redução do número de nematoides na raiz, o que confirma o efeito das AgNPs em plantas de soja. Experimentos adicionais serão realizados futuramente para estudar a estabilidade das AgNPs ao armazenamento, e mais concentrações que possam vir a ser utilizadas para obtenção do mesmo efeito nematicida. Trata-se de uma alternativa verde e sustentável que pode ser explorada no campo de ciências agrárias para incorporação destes sistemas nanoparticulados na agricultura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, Z. *et al.* Leaf extract mediated biogenic process for the decoration of graphene with silver nanoparticles. **Materials Letters**, v.178, p.115-119, 2016.
- ABDELMONEIM T.; MASSOUD, S. I. Biosynthesis of silver nanoparticles (agnps) by pseudomonas aeruginosa and their potential as nematicidal activity. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 4, p. 297–387. 2016.
- EL-SALAM, Mohamed H Abd; EL-SHIBINY, Safinaz. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review. **International Journal Of Dairy Technology**, Egypt, v. 65, n. 1, p. 13-21, 27 out. 2011. Wiley.
- ADAMS, B. D.; ADAMS, W W. Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 599-626, jun. 1992. Annual Reviews.
- ALMEIDA, J. A.; SOUZA, J. C.; ARAÚJO, F. G. Tratamento de sementes com abamectina e Paecilomyces lilacinus no manejo de Heterodera glycines na cultura da soja. **Multi-Science Journal**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 62-65, 18 mar. 2018. Multi-Science Journal.
- AMORIM L.; BERGAMIN FILHO A.; REZENDE, J. A. **Manual de Fitopatologia**. V. 1. 5 edi. São Paulo: Ceres, 2018. p. 573.
- ARAÚJO, F. G. D. *et al.* Effect of resistant and susceptible soybean cultivars on the development of male and female Heterodera glycines Ichinohe. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 43, p. 4082-4086, 2015.
- BANIK S.; PÉREZ-DE-LUQUE, A. In vitro effects of copper nanoparticles on plant pathogens, beneficial microbes and crop plants. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 2, p. e1005, 2017.
- SILVA, L. P. *et al.* Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas", p. 967 -1012. *In*: RESENDE, Rodrigo Ribeiro (Org.). **Biotechnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. v. 4. São Paulo: Blucher, 2017.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo. *In*: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1977. p. 1-6.
- CARMELLO, Q. A. C.; OLIVEIRA, F. A. Nutrição de lavouras de soja: situação atual e perspectivas. **Visão agrícola**, n. 5, Esalq, 2006. p 9.
- CASTANEDA-ALVAREZ, C.; ABALLAY, E. Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Basel, v. 32, n. 203, p. 1-7, 2016.
- CAUEHFF, A.; CASTRO, G. Bionanoparticles, a green nanochemistry approach. **Electronic Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 1-1, 15 maio 2013. Elsevier BV.

CHUNG, G.; SINGH, R.J. Broadening the Genetic Base of Soybean: a multidisciplinary approach. **Critical Reviews In Plant Sciences**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 295-341, 25 set. 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção nacional de grãos e estimativas**. Brasília: CONAB, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4579-producao-nacional-de-graos-e-estimada-em-269-3-milhoes-de-toneladas-na-safra-2021-22>. Acesso: 10/08/2022.

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

DORIA, G. *et al.* Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. **Sensors**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 1657-1687, 7 fev. 2012. MDPI AG.

EL-DEEN, Ahmed Hammad Nour; EL-DEEB, Bahig Ahmed. Effectiveness of Silver Nanoparticles against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* Infecting Tomato under Greenhouse Conditions. **Journal Of Agricultural Science**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 148, 12 jan. 2018. Canadian Center of Science and Education.

FERRAZ, S. *et al.* **Manejo Sustentável de Fitonematoides**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2010. 306 p.

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

FERRAZ, L. C. C. B. O nematoide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 96, p. 23-27, 2006.

FRANCHINI, J.C. *et al.* Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja do estado de Mato Grosso. *In*: FUNDAÇÃO MT. (Org.). **Boletim de Pesquisa de Soja**. ed. 14. Rondonópolis: Fundação MT, 2010. p. 289-296.

GONZAGA, V. **Caracterização morfológica, morfométrica e multiplicação in vitro das seis espécies mais comuns de *Pratylenchus*. Filipjev, 1936 que ocorrem no Brasil**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GLOBAL CROP PROTECTION. **Prejuízos com nematoides chegam a R\$35 milhões por ano**. [S.l.]: Global crop, [S.d.]. Disponível em: <https://globalcropprotection.com/noticias/uso-e-aplicacao/prejuizos-com-nematoides-chegam-a-35-bilhoes-de-r-por-ano/>. Acesso em 29/08/2022.

GUNASEKARAN, Thirumurugan; NIGUSSE, Tadele; DHANARAJU, Magharla Dasaratha. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. **Journal Of The American College Of Clinical Wound Specialists**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 82-96, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcws.2012.05.001>.

HAMED, Seham M.; HAGAG, Eman S.; EL-RAOUF, Neveen Abd. Green production of silver nanoparticles, evaluation of their nematicidal activity against *Meloidogyne javanica* and their impact on growth of faba bean. **Beni-Suef University Journal Of**

**Basic And Applied Sciences**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-1, 8 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

HASHEMINYA, S, M.; JALAL, D. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Eryngium caucasicum* Trautv aqueous extracts and its antioxidant and antimicrobial properties. **Particulate Science And Technology**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 1019-1026, 3 set. 2019.

HASSAN, Maggie E. M. *et al.* Comparison Study Between Silver Nanoparticles and Two Nematicides Against *Meloidogyne incognita* on Tomato Seedlings. **Plant Pathology Journal**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 144-151, 15 set. 2016.

HENNING, A. A. *et al.* **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

HENNING, A. A. **Patologia e Tratamento de Semente: Noções Gerais**. Londrina: Embrapa, 2005. 52p.

INGALE, A. G. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an ecofriendly approach. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 04, n. 02, 2013.

INOMOTO, M. M. Importância do manejo de *Pratylenchus brachyurus*, como manejar nematóides em soja. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 108, p. 4-9, 2009.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 2638, 2011.

JIANG, A. C. D. *et al.* Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. **Environmental And Experimental Botany**, [S.L.], v. 55, n. 1-2, p. 87-96, jan. 2006.

JONES, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KALAISELVI, D. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using latex extract of *Euphorbia tirucalli*: A novel approach for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 117, p. 108-114, 2019.

KHAN, A. A. *et al.* Pomegranate peel induced biogenic synthesis of silver nanoparticles and their multifaceted potential against intracellular pathogen and cancer. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 4191-4200, ago. 2021.

KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de comprimento de raiz de plântula de soja. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.2, n.1, p.11-14, 1991.

KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 1-18, jan. 2010.

LEMIRE, J.; HARRISON, J.; TURNER, R. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat Rev Microbiol**, v.11, p.371–384, 2013.

LINDSEY, D. W.; CAIRNS, E. J. Pathogenicity of the lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, on six soybean cultivars. **Journal of Nematology, Loudonville**, v. 3, n. 3, p. 220-226, 1971.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas Nematoides da Soja 203 cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1992. 315p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. 889 p

MISHRA, Sandhya *et al.* Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. **PloS one**, v. 9, n. 5 e97881. 19 May. 2014.

MITTAL, A. *et al.* Nontargeted Identification of the Phenolic and Other Compounds of *Saraca asoca* by High Performance Liquid Chromatography-Positive Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Isrn Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 2013, p. 1-10, 5 ago. 2013. Hindawi Limited.

MOODY, E. H.; LOWNSBERY, B. F.; AHMED, J. M. Culture of rootlesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, v.5, p.225-226, 1973.

MOUSTAFA, A. *et al.* Nematicidal activity of silver nanoparticles of botanical products against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.50, p.909-926, 2017.

MUHAMMAD, N. *et al.* Metal activated carbon as an efficient filler for high-density Polyethylene nanocomposites. **Polymer Composites**, v. 41, p. 3184-3193, 2020

MUKHERJEE, Sudip; NETHI, Susheel Kumar. Biological Synthesis of Nanoparticles Using Bacteria. **Nanotechnology For Agriculture**, [S.L.], p. 37-51, 2019. Springer Singapore.

MUKHERJEE, Sudip; PATRA, Chitta Ranjan. Biologically synthesized metal nanoparticles: recent advancement and future perspectives in cancer theranostics. **Future Science Oa**, [S.L.], v. 3, n. 3, ago. 2017.

MÜLLER, L. Taxonomia e morfologia. *In*: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. 1 ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 65-104, 1981.

NASSAR, A. M. K. Effectiveness of Silver Nano-particles of Extracts of *Urtica urens* (Urticaceae) Against Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Asian Journal of Nematology**, v. 5, 2016, p. 14-19.

PAIVA, B. M.; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. Aspectos socioeconômicos da soja. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 27, n. 230, p. 7-14, 2006.

PÉREZ-DE-LUQUE A.; RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest management science**, v. 65, n. 5, 2009, p. 540-545.

PRATHNA, T. C. *et al.* Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, 2011, p. 152-159.

RAI, P. K. *et al.* Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture. **Environment International**, V. 119, 2018, p. 1-19

RIBEIRO, N. R. W. P.; DIAS, J. M. Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja do estado de Mato Grosso. *In*: FUNDAÇÃO MT. (Org.). **Boletim de Pesquisa de Soja**. Rondonópolis: Fundação MT. v. 14, 2010, p. 289-296.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; CANULLO G.H. Cropping systems for the management of phytonematodes. **Phytoparasitica**, v. 20, 1992, p. 211-224.

ROMAN, J.; HIRSCHMANN, H. Morphology and morphometrics of six species of *Pratylenchus*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 1, n. 4, p. 363-386, 1969.

RUBIA, M. T. Manual de nematologia. **Institut de reserca y formación agrária**, 2004, p. 1-23.

SANDEEP, D.; BIRADARPATIL, N. K. Biosynthesis of silver nanoparticles using soybean seed extract. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, 2018.

TAYLOR, A. L. **Introductions to research on plant nematology**. Rome: FAO, 1971.133 p.

THAKKAR, Kaushik N.; MHATRE, Snehit S.; PARIKH, Rasesh Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 257-262, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>.

TRENTIN, R. *et al.* Subperíodos fenológicos e ciclo da soja conforme grupos de maturidade e datas de semeadura. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.48, n.7, p.703-713, jul. 2013.

USDA - U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Soybeans exports and highlights**. United States: USDA, [s.d.]. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/commodities/soybeans>. Acesso em: 01 set. 2022.