

Síntese verde de nanopartículas de prata para o controle de *Pratylenchus brachyurus* em soja

Letícia Santana Oliveira¹, Luciano Paulino Silva², Thalisson Rosa Araújo¹, Vitória Laize Batista Monteiro¹, Thaís Ribeiro Santiago^{1*}

RESUMO

Extratos de folhas (F) e sementes de soja (S) 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 absorvância realizadas em leitura espectrofotométrica UV-Vis entre 350-550 nm e inspeção visual das colorações das suspensões. Apenas as reações para síntese de AgNPs realizadas nas concentrações de 3,12 (AgNP3.12F e AgNP3.12S); 6,25 (AgNP6.25F e AgNP6.25S) e 12,5 mg/mL (AgNP12.5F e AgNP12.5S) 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 (AgNO₃). 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), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e sua atividade antimicrobiana foi avaliada *in vitro* contra o fitonematoide *Pratylenchus brachyurus*. As AgNPs apresentaram forma arredondada, tamanho nanométrico, carga negativa e polidispersividade e estabilidade moderadas. Foi possível observar uma correlação entre o aumento da concentração de extrato com aumento do potencial Zeta. A atividade inibitória do ensaio de funil de Baermann revelou uma alta atividade nematotóxica das AgNPs contra *P. brachyurus* e alteração das características morfológicas dos nematoides. Com base nos resultados, as AgNPs biossintetizadas a partir do extrato vegetal de soja representam um agente antimicrobiano promissor para seu uso no controle do nematoide das lesões.

Palavras-chave: nematoide das lesões; nanotecnologia verde; nanopartículas de prata.

INTRODUÇÃO

Segundo levantamento realizado em junho de 2019 pela CONAB, a produção anual de soja no Brasil foi de 114,843 milhões de toneladas em uma área plantada de 35,822 milhões de hectares. A produtividade da cultura da soja poderia ser ainda maior, mas a cultura é alvo de inúmeras pragas e doenças. O nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) destaca-se como uma das espécies mais importantes do ponto de vista agrônomo devido aos danos causados à cultura. O nematoide invade a raiz da planta, injeta toxinas durante sua alimentação e causa danos mecânicos durante seu movimento migratório. As raízes têm seu tamanho reduzido e sintoma de necrose, o que prejudica a absorção de água e nutrientes para desenvolvimento do ciclo de vida da planta.

Atualmente, a principal forma de controle dessa doença envolve a utilização de nematicidas, no entanto estes apresentam custo e grau de toxicidade elevados. Além disso, com o aumento do uso desses defensivos químicos, já existem relatos de parasitas que adquiriram resistência e alguns produtos já não são efetivos no controle. Sendo assim, são necessárias pesquisas para o desenvolvimento de novas alternativas para ampliar as opções dos produtores que sofrem com constantes perdas causadas por esse fitonematoide. Uma alternativa é o uso da síntese verde para formação de sistemas nanoparticulados, que quando aplicados à agricultura, possibilitam a

¹ Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília-DF

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Asa Norte, Brasília-DF

* Autor de correspondência: thais.santiago@unb.br

minimização do uso de insumos químicos e a diminuição do acúmulo de resíduos nocivos no solo e na água. Nanopartículas de prata (AgNPs) são empregadas em uma variedade de aplicações devido ao seu amplo espectro biocida (Mukherjee e Prata, 2017). Recentes estudos como Kalaiselvi et al. (2019) e Moustafa et al. (2017) mostram a eficiência das AgNPs no controle do nematoide das galhas, *Meloidogynes* spp., interferindo na eclosão de ovos, bloqueio e migração no J2 na raiz da planta. No entanto, nenhum trabalho testou a eficiência de AgNPs no controle do nematoide das lesões. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo: (i) a síntese e caracterização de AgNPs utilizando diferentes concentrações de extrato da folha e sementes de soja; (ii) avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana das AgNPs no controle de *P. brachyurus*; e (iii) avaliação de possíveis alterações morfológicas em *P. brachyurus* causadas por AgNPs.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese e caracterização das nanopartículas

Folhas de soja sadias e sementes orgânicas de soja foram utilizadas para síntese verde de AgNPs no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para a síntese verde das AgNPs, nitrato de prata (AgNO₃) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi utilizado como o sal do metal precursor em solução aquosa na concentração final de 1 mM. As reações de síntese foram realizadas variando as concentrações de extrato vegetal aquoso de folha (F) e semente orgânica (S) 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL por 2,5 h a 75°C. A formação de AgNPs foi confirmada pela mudança na absorvância nos comprimentos de onda de 350-550 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Brasil).

A avaliação das características das AgNPs foi realizada utilizando a metodologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas e homogeneidade de tamanho das partículas pelo índice de polidispersividade (PdI); e mobilidade eletroforética para determinar o potencial Zeta. Todas as medidas foram realizadas utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido). Para complementar a caracterização, as AgNPs formadas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando o equipamento JEM-1011 (Jeol, Tóquio, Japão).

Obtenção do inóculo e teste in vitro

Os espécimes de *P. brachyurus* utilizados como inóculo nos experimentos foram obtidos de raízes de soja da região do PAD-DF pelo método de Coolen e D’Herde (1972). A confirmação da espécie foi realizada avaliando as características morfológicas dos fitonematoides. Para avaliar a efetividades *in vitro* das AgNPs no controle do *P. brachyurus*, a metodologia utilizada foi do funil de Baermann modificado (Hooper, 1986). Na suspensão obtida, em torno de 136 exemplares por mL foram estimados, sob microscópio de luz e com auxílio de lâmina de Peters. Os nematoides foram expostos às AgNPs na concentração de ensaio de 250 µM durante 48 h em um volume total de 10 mL contendo duas repetições cada tratamento. Apenas os nematoides que passaram pelo funil foram contados com auxílio da câmara de Peters. Os resultados das contagens de nematoides foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste LSD (5% de probabilidade). As análises estatísticas e gráficas foram obtidas com R (Core Team, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cores das suspensões foram avaliadas visualmente, assim como por espectrofotometria. As suspensões de AgNPs foram medidas em região visível de 350-550 nm (dados não mostrados), confirmando a formação. 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), que é altamente dependente da forma e tamanho dos AgNPs (Amendola et al. 2010). Apenas as AgNPs sintetizadas com 3,12; 6,25 e 12,5 mg/mL de extrato aquoso de F e S tiveram os picos entre os comprimentos de onda de 410-450, indicando a

formação de AgNPs. A intensidade da suspensão foi significativamente aumentada nas maiores concentrações do extrato vegetal, principalmente na concentração de 12,5 mg/mL. Conseqüentemente, a quantidade do agente redutor no extrato vegetal é capaz de alterar as propriedades estruturais, físico-químicas e até mesmo funcionais das AgNPs. Os controles negativos do experimento, água ultrapura ao invés de extrato, não deram qualquer indício da formação de estruturas em função do efeito de RPS e conseqüentemente não formaram AgNPs.

Não foi possível observar nenhuma correlação direta entre concentração de extrato de F ou S, com diâmetro hidrodinâmico. A suspensão utilizando 6,25 mg/mL de extrato de S apresentou o menor tamanho ($88,7 \pm 6,2$ nm) e 3,12 ($173,8 \pm 13,4$ nm) o maior tamanho hidrodinâmico, indicação de formação de AgNPs (Tabela 1). A produção de AgNPs com diâmetros hidrodinâmicos entre 20-500 nm é relatada por diversos autores que realizam a síntese verde utilizando extratos de plantas. Assim, demonstrou-se a capacidade do extrato vegetal de soja na produção de AgNPs. As imagens obtidas por MET mostraram que as AgNPs sintetizadas são esféricas, dispersas, sem a formação de aglomerados e com moderada variação de tamanho (Tabela 1 e Fig. 1). Uma característica marcante das AgNPs sintetizadas com extratos vegetais de soja é confirmada pelo valor de PDI acima de 0,200 que indica uma distribuição de tamanho das AgNPs polidispersa (Murdock et al. 2008). O potencial Zeta das AgNPs apresentam valores negativo e variou de -1,4 a -13,7 mV. Baseado nestes valores considera-se que as AgNPs são moderadamente estáveis coloidalmente. É possível correlacionar o aumento do extrato de F e S com o aumento do potencial Zeta (Tabela 1)

Tabela 1. Tamanho hidrodinâmico (Z-médio), índices de polidispersividade (PDI), potenciais Zeta (Z) de AgNPs produzidas com extratos aquosos das folhas (F) e sementes de soja (S) nas concentrações do extrato de 3.12 (AgNP3.12); 6.25 (AgNP6.25) e 12,5 (AgNP12.5) e teste do funil de Baermann assim como número de nematoides (D) viáveis após a exposição às AgNPs.

	Nanopartículas						Controle
	AgNP3.12F	AgNP3.12S	AgNP6.25F	AgNP6.25S	AgNP12.5F	AgNP12.5S	
Z-médio	244,4 ± 13,7	173,8 ± 13,4	223,2 ± 8,3	88,7 ± 6,2	232,4 ± 0,5	415,6 ± 18,9	-
PDI	0,434 ± 0,050	0,370 ± 0,043	0,505 ± 0,054	0,603 ± 0,081	0,470 ± 0,042	0,505 ± 0,111	-
Z	1,4 ± 0,6	3,0 ± 0,3	10,7 ± 1,1	4,2 ± 2,1	12,8 ± 2,6	13,7 ± 6,9	-
Funil de Baermann	13,5 ± 0,7*	19,0 ± 12,7*	55,5 ± 7,7*	17,0 ± 0,0*	57,7 ± 28,9*	63,5 ± 21,9*	264 ± 10,2

* Diferença estatística com $p < 0,05$

O efeito das seis de AgNPs contra *P. brachyurus* foi testado *in vitro*. A contagem dos nematoides em contato com as nanopartículas na concentração de 250 µM após 48 h de incubação que passaram pelo funil de Baermann reduziu consideravelmente em comparação aos nematoides que estavam em contato com água. 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). Os fitonematoides que permaneceram em contato com as AgNPs apresentaram algumas deformidades em estruturas como esôfago e estilete (dados não mostrados). Aqueles que faziam parte dos controles eram grandes, robustos, apresentavam estruturas bem definidas e estavam em constante movimento. As análises estatísticas confirmaram que não houve diferença entre as AgNPs, e que estas apenas diferenciaram dos controles (Tabela 1).

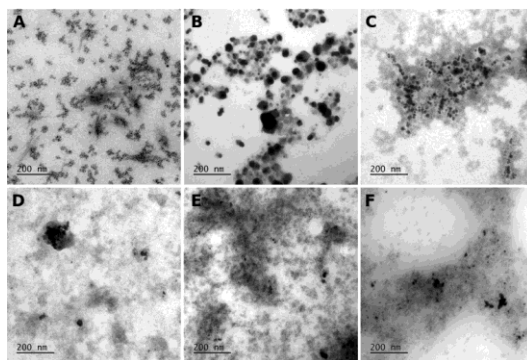


Figura 1. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das AgNPs sintetizadas utilizando 3,12 mg/mL (A, D), 6,25 mg/mL (B, E) e 12,5 mg/mL (C, F) de extrato vegetal aquoso de folhas (A, B e C) e sementes (D, E e F) orgânicas de soja.

CONCLUSÃO

No presente estudo demonstrou-se que extratos aquosos de folhas e sementes de soja foram eficientes na produção de AgNPs quando utilizadas as concentrações de extrato aquoso de 3,12 mg/mL, 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL. Os diâmetros hidrodinâmicos dessas nanoestruturas variaram de 90 a 450 nm e apresentaram formato esférico, polidispersividade moderada e caracterizadas como coloidalmente estáveis. Pode-se observar a eficiência das AgNPs na ação nematicida a *P. brachyurus* na concentração testada de 250 μ M. Experimentos adicionais serão realizados futuramente para estudar a estabilidade ao armazenamento das AgNPs, efetividade *in vivo* e mecanismo de ação. Trata-se de uma alternativa verde e sustentável que deve ser explorada no campo de ciências agrárias para incorporação destes sistemas nanoparticulados.

AGRADECIMENTOS:



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAGHRABI, O.A.; MASSOUD, S.I.; ABDELMONEIM, T.S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse condition. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v.20, n.1, p.57-61, 2013.
- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. *State Agriculture Research Center – GHENT, Belgium*. p.77. 1972.
- HOOVER, D.J. Extraction of free-living stages from soil. 6 ed. London In: Southey, J.F. (Ed.) *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Her Majesty's Stationery Office. 1986. pp.5-30.
- KALAISEVI, D.; MOHANKUMARA, A.; SHANMUGAMA, G.; NIVITHAB, S.; SUNDARARAJ, P. 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.
- MOUSTAFA, A.; ABDEL-RASOUL, A.M.A.; NASSAR, A.M.K.; SOLIMAN, B.S.M. 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.
- MUKHERJEE, S.; PATRA, C.R. Biologically synthesized metal nanoparticles: recent advancement and future perspectives in cancer theranostics. *Future Science OA* 3:Fso203, 2017.
- MURDOCK, R.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A.M.; SCHLAGER, J.J.; HUSSAIN, S.M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicology Science* v.101, n.2, p.239–253, 2008.