

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

MÁRCIO LEANDRO DA SILVEIRA FONSECA

DINÂMICA DA DEGRADAÇÃO DE dsRNA PURO E ENCAPSULADO NO SOLO

CRUZ DAS ALMAS

2023

MÁRCIO LEANDRO DA SILVEIRA FONSECA

DINÂMICA DA DEGRADAÇÃO DE dsRNA PURO E ENCAPSULADO NO SOLO

Trabalho de conclusão de curso II apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Luz Ribeiro
Coorientador: Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

CRUZ DAS ALMAS

2023

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Tabela com as principais características físicas e químicas de um solo Latossolo amarela...	11
Figura 2 - Curva de amplificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) das amostras de 0 a 192 horas (A), 216 a 360 horas (B) e 552 a 1440 horas (C).....	15
Figura 3 - Curva de amplificação da amostra de 264 horas (azul), controle positivo (rosa) e branco (vermelho) em relação a linha Threshold (Ct).....	16
Figura 4 - Comparação do Ct (número de ciclos) de dsRNA em amostras de dsRNA puro, encapsulado em HDL, e quitosana até 1440h.....	16
Figura 5 - Curva de dissociação padrão obtida por qPCR, com relação linear entre a fluorescência e a temperatura de fusão da dupla fita.....	19

Sumário

SUMÁRIO	3
1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4 CONCLUSÃO	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

DINÂMICA DA DEGRADAÇÃO DE dsRNA PURO E ENCAPSULADO NO SOLO

MÁRCIO LEANDRO DA SILVEIRA FONSECA

CRUZ DAS ALMAS

2023

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO

Márcio Leandro da Silveira Fonseca

**DINÂMICA DA DEGRADAÇÃO DE dsRNA PURO E
ENCAPSULADO NO SOLO**

BANCA EXAMINADORA

Patricia Luz Ribeiro

Profa. Dra. Patrícia Luz Ribeiro
orientadora

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Aline Simões da Rocha Bispo

Dra. Aline Simões da Rocha Bispo
EMBRAPA, Cruz das Almas-BA

Paulo Henrique da Silva

Prof. Dr. Paulo Henrique da Silva
EMBRAPA, Cruz das Almas-BA

CRUZ DAS ALMAS

Maio de 2023

DINÂMICA DA DEGRADAÇÃO DE dsRNA PURO E ENCAPSULADO NO SOLO

Resumo: A proteção das plantações contra patógenos é um desafio complexo devido à variabilidade desses patógenos em termos de tempo, espaço e genótipo, além de sua capacidade evolutiva que muitas vezes supera a resistência das plantas. Recentemente, o RNA de interferência (RNAi) tem sido estudado como uma estratégia promissora no controle de patógenos em plantas. O RNAi é um mecanismo de defesa antiviral presente em organismos eucarióticos que silencia genes homólogos, tanto na transcrição quanto no pós-transcricional. A aplicação de produtos baseados em RNA de fita dupla tem mostrado potencial como uma nova solução de manejo de fitopatógenos, oferecendo eficiência e especificidade superiores aos métodos convencionais, sendo capazes de direcionar e afetar seletivamente os fitopatógenos, atuando especificamente nos patógenos, minimizando o impacto em outras espécies não alvo. A metodologia utilizada nesse estudo envolveu a encapsulação do dsRNA em nanopartículas compostas por quitosana e HDL, com o objetivo de avaliar sua viabilidade no solo. Foram coletadas amostras de solo, nas quais o dsRNA foi aplicado, e o material genético foi extraído e analisado em diferentes tempos, variando de 24 a 1440 horas. A quantificação de dsRNA no solo foi determinada pela transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados revelaram que o tratamento com HDL resultou em uma maior quantidade de dsRNA detectada no solo, indicando uma maior permanência e acúmulo do material no solo. Esses achados destacam a eficiência da metodologia utilizada para detecção e estabilização do dsRNA no solo, superando resultados menos satisfatórios de estudos anteriores. Essas descobertas fornecem insights valiosos para o controle de patógenos em plantações, destacando o potencial dessa metodologia para fortalecer o manejo fitossanitário e contribuir para a segurança alimentar.

Palavras-chave: Nanopartículas, Fitopatógenos, Duplexes, RNAi

1 INTRODUÇÃO

Os organismos fitopatogênicos são responsáveis por graves prejuízos às culturas agrícolas, causando uma significativa diminuição na produtividade e na qualidade dos produtos finais. Tais perdas econômicas não apenas afetam negativamente a segurança alimentar, como também podem representar uma considerável parcela dos gastos de produção, estimando-se que de 10% a 16% do custo da lavoura esteja associado ao controle de doenças (SAVARY, 2019).

Atualmente, a principal medida utilizada no manuseio de fitopatógenos constitui na aplicação de produtos químicos na agricultura, estratégia que contribui para o aumento no custo de produção, e resulta no surgimento de isolados resistentes ou tolerantes, além de provocar danos ao meio ambiente, saúde humana e animal (NELSON, 2020). Assim, há uma forte demanda para o desenvolvimento de novas ferramentas que contribuam para o controle eficiente dos fitopatógenos de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável.

RNAi é um mecanismo de regulação da expressão gênica e defesa antiviral em organismos eucariotos, desencadeado pela presença de moléculas de RNA de fita dupla (double-strand - dsRNA), ocasionando o silenciamento gênico transcricional ou pós transcricional do gene homólogo (ZHANG et al., 2020). O RNA de interferência (RNAi) tem se destacado como uma potencial ferramenta no controle de patógenos, devido à sua alta especificidade para o alvo, eficiência no controle e baixo impacto ambiental (ROSA et al., 2018).

Diversas instituições conduziram estudos que comprovaram a resistência de plantas geneticamente modificadas contendo fragmentos genômicos de fitopatógenos aos seus respectivos alvos (RÊGO-MACHADO et al., 2020). As plantas modificadas geneticamente com fragmentos genômicos de fitopatógenos demonstraram uma significativa resistência à infecção pelos vírus homólogos, como comprovado em estudos realizados por Lindbo e Dougherty (1992) e Lindbo et al. (1993). O principal objetivo desses trabalhos científicos era proteger as plantas contra viroses, por meio da inserção de uma cópia da região codificante da capa proteica (CP) viral no material genético vegetal.

O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, que expressam dsRNA específicos de patógenos, foi o método utilizado para a produção de moléculas de RNA em plantas, um mecanismo biotecnológico de silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (HIGS) (KOCH; KOGEL, 2014). Nos últimos anos, houve um avanço no estudo sobre esse mecanismo, e diversos trabalhos descritos na revisão de (GHAG, 2017), confirmaram a eficiência do silenciamento gênico para a proteção de plantas contra patógenos, por meio da produção de plantas transgênicas.

A utilização de produtos baseados em RNA de fita dupla surge como uma possível alternativa ao manejo de fitopatógenos, com resultados mais eficazes e específicos quando comparados aos métodos tradicionais (JOGA et al., 2016; ZOTTI, 2018). Nesse sentido, tem sido desenvolvida uma nova metodologia para a entrega de duplexes de RNA em plantas, seja de forma pura ou em associação com um agente estabilizante, com o objetivo de viabilizar a introdução exógena dessas moléculas no organismo vegetal.

O emprego dessa metodologia apresenta uma série de vantagens significativas, tais como o aumento na taxa de crescimento, a capacidade de customização da sua estrutura, a otimização do processo de produção, bem como a facilidade de aplicação e a maior aceitação por parte dos consumidores, já que não envolve modificações genéticas artificiais. Entretanto, é importante ressaltar que essas moléculas possuem uma elevada instabilidade no ambiente (FLETCHER, 2020).

O solo é frequentemente apontado como o principal receptor de proteínas e ácidos nucleicos produzidos pelas plantas, bem como aqueles aplicados externamente à sua superfície (FISCHER et al., 2016). Entretanto, Dubelman e colaboradores (2014) demonstraram que o dsRNA apresenta rápida degradação em diversos solos agrícolas, com meia-vida de 15 a 23 horas e se tornando indetectável após 48 horas. A degradação do dsRNA é independente da quantidade aplicada aosolo, resultados esses que corroboram com diversos estudos que indicam a improbabilidade da conservação de ácidos nucleicos em solos naturais (GREAVES; WILSON, 1970, GULDEN et al., 2005; KEOWN et al., 2004; LEVY-BOOTH et al., 2008).

A degradação de DNA e RNA no ambiente do solo ocorre, em grande parte, devido à ação de DNases e RNases (BLUM et al., 1997). As bactérias utilizam fragmentos de DNA, nucleotídeos e nucleosídeos para o seu crescimento (FINKEL et al., 2001), além de liberarem nucleases no ambiente circundante, com a finalidade de eliminar recursos (BENEDIK; STRYCH, 1998). A meia-vida das sequências de DNA é reduzida com o aumento da temperatura, relacionada aos processos enzimáticos responsáveis pela

degradação do DNA livre (GULDEN et al.,2005).

Para contornar o problema da rápida degradação de RNA em solos, tem sido desenvolvida uma abordagem que utiliza compostos ou materiais aditivos para aumentar a estabilidade das moléculas de RNA. Uma estratégia promissora é a utilização de RNAs conjugados a nanopartículas, as quais são capazes de atravessar a parede celular vegetal sem anecessidade de forças externas e possuem propriedades físico-químicas ajustáveis, possibilitando sua aplicabilidade em diversas plantas hospedeiras (CUNNINGHAM et al., 2018).

Em um estudo sobre a praga *Euschistus heros*, que afeta as plantações de soja, foi observado que a utilização de complexos de lipossomos resultou em um aumento na mortalidade das ninfas que se alimentaram das formulações, em comparação com a utilização de dsRNA puro (CASTELLANOS, 2019). O uso de RNA combinado com compostos ou materiais estabilizadores, como nanopartículas e lipossomos, pode ser ampliado para o controle de fitopatógenos. Essa biotecnologia é importante para garantir a integridade das moléculas, aumentar a longevidade da resistência induzida, permitir a penetração nos tecidos vegetais e, principalmente, viabilizar a estratégia de uso tópico em campo.

Ao direcionar especificamente os fitopatógenos e fornecer uma liberação controlada do dsRNA, as nanopartículas ajudam a minimizar a exposição de organismos não alvo e reduzem a necessidade de aplicações repetidas. Além disso, a utilização de dsRNA com nanopartículas oferece a possibilidade de diminuir a quantidade de produtos químicos aplicados no solo, resultando em uma melhoria na qualidade do solo, reduzindo a contaminação e promovendo um ambiente mais saudável para a fauna e a flora (GEBREMICHAEL et al., 2021). Portanto, o uso de dsRNA encapsulado em nanopartículas no solo representa uma estratégia promissora e ecologicamente amigável para o manejo de fitopatógenos, contribuindo para a preservação e sustentabilidade do meio ambiente.

A utilização de dsRNA encapsulado em lipossomos tem sido objeto de investigação. Lipossomos são vesículas esféricas nanométricas constituídas principalmente por fosfolipídios, que possuem uma fase aquosa totalmente cercada por uma ou mais bicamadas lipídicas. Essas vesículas são capazes de encapsular ácidos nucleicos ou princípios ativos e liberá-los nos sítios de ação sem causar danos (EDWARDS; BAEUMNER 2006). Os lipossomos são altamente versáteis para fins de pesquisa, pois são biodegradáveis e biocompatíveis. A encapsulação de dsRNA em

lipossomos resulta em uma maior estabilidade das moléculas (LIN et al., 2017).

Em um estudo sobre a praga *Euschistus heros*, que afeta as plantações de soja, foi observado que a utilização de complexos de lipossomos resultou em um aumento na mortalidade das ninfas que se alimentaram das formulações, em comparação com a utilização de dsRNA puro (CASTELLANOS et al., 2019). O uso de RNA combinado com compostos ou materiais estabilizadores, como nanopartículas e lipossomos, pode ser ampliado para o controle de fitopatógenos. Essa biotecnologia é importante para garantir a integridade das moléculas, aumentar a longevidade da resistência induzida, permitir a penetração nos tecidos vegetais e, principalmente, viabilizar a estratégia de uso tópico em campo.

A relação entre o uso de RNA combinado com compostos estabilizadores, como nanopartículas e lipossomos, e a tecnologia de PCR quantitativa baseada em fluorescência em tempo real (qPCR) reside no contexto da biotecnologia agrícola e no controle de fitopatógenos. A tecnologia de PCR quantitativa baseada em fluorescência em tempo real (qPCR) é uma técnica inovadora usada para análise de expressão gênica, oferecendo uma variedade de protocolos, produtos químicos e instrumentos (BUSTIN, 2005; YAN, 2012). Este método rápido e vantajoso de PCR combina a RT-PCR tradicional com o fenômeno de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), que utiliza marcadores fluorogênicos covalentemente ligados aos primers, permitindo que o usuário acompanhe a reação de PCR em tempo real através de alterações na intensidade de fluorescência durante a reação (WAGNER, 2013).

A qPCR é uma técnica benéfica devido à sua capacidade de detectar e medir quantidades mínimas de ácidos nucleicos em uma ampla variedade de amostras de diferentes fontes (KUBISTA, 2006). A combinação de simplicidade prática, velocidade, sensibilidade e especificidade tornou essa técnica altamente favorável para a quantificação de ácidos nucleicos (BUSTIN, 2009). Muitas aplicações de diagnóstico foram desenvolvidas, incluindo a determinação e dosagem gênica, identificação de indivíduos geneticamente modificados e uso em investigações forenses (SUAREZ, 2010). Além disso, a revisão de Mark (2021) destaca a importância da utilização da qPCR na microbiologia ambiental.

A qPCR apresenta alta precisão e confiabilidade na quantificação de ácidos nucleicos em amostras com baixa concentração de DNA, como amostras clínicas ou ambientais, e permite a quantificação relativa da expressão gênica em diferentes amostras, utilizando genes de referência para normalização dos dados (BUSTIN, 2005). Em resumo,

a qPCR supera a técnica convencional de PCR em termos de sensibilidade, precisão, confiabilidade e facilidade de interpretação dos resultados.

Embasado no exposto acima, este trabalho teve como objetivo, avaliar a viabilidade de dsRNAs nanoencapsulados e aplicados ao solo, por meio da análise de sua degradação ao longo do tempo, utilizando técnicas de qPCR para detectar e quantificar a presença dessas moléculas em intervalos de tempo, variando de 24 a 1440 horas após a aplicação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta do solo e Seleção do dsRNA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF). O dsRNA utilizado para execução deste experimento é homólogo ao gene da proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein, GFP – dsRNA-GFP*), utilizado como um gene referência ou controle. A amostra de solo foi coletada na área onde está estabelecido o Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) em Cruz das Almas – BA. O solo é do tipo Latossolo amarelo distrófico A moderado, com textura franco argilo-arenosa.

Profundidade (cm)	Atributos físicos			Atributos químicos		
	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	pH (H ₂ O)	CTC	M.O
0-20	g kg ⁻¹				cmol _c dm ⁻³	g kg ⁻¹
	715	103	182	7,0	6,10	30,0

Figura 1 Principais características físicas e químicas do solo Latossolo amarelo distrófico, (Souza; Souza, 2001).

Coleta de solo e aplicação do dsRNA

Para coletar a amostra de solo, um tubo galvanizado de 5/8" foi inserido no solo até uma profundidade de 10 cm. A amostra foi coletada em um Becker de 200 mL e, posteriormente, homogeneizada para obtenção de três subamostras de 50 g de solo e montagem do experimento. Para cada Becker, foram adicionados, 3 mL de uma solução aquosa contendo um total de 7,5 µg de dsRNA-GFP puro bem como de dsRNA complexado em HDL e quitosana. Após adição, 1 g de solo com dsRNA foi transferido para tubos Falcon de 15 mL. Todos os tubos foram vedados com papel alumínio, simulando a baixa luminosidade da rizosfera e mantidos à temperatura ambiente por períodos de incubação pré-estabelecidos de 24 a 1440 horas. Para o controle negativo, foi utilizada uma amostra de solo não tratada com a solução de dsRNA. Todo o experimento foi conduzido em duplicata.

Extração das amostras

Após o período determinado para o teste, o solo foi diluído em 10 mL de tampão PBST pH 7 (1 mM de KH_2PO_4 , 10 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl pH 7,0), (DUBELMAN et al., 2014). As amostras foram centrifugadas a 150x g por 10 minutos, e filtradas em microtubos Eppendorf de 2 mL, com auxílio de seringas de 5 mL e filtros de 0,22 µm.

Para extração, 100 µL do filtrado foram transferidos para um microtubo de 2 mL, adicionado 1 mL de Trizol® e 200 µL de clorofórmio. Em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugadas à 12.000x g por 15 minutos, à 4 °C.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, e o dsRNA precipitado pela adição de 1 mL de isopropanol e centrifugado a 12.000x g por 10 min. Descartado o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 75%, centrifugado à 7500xg por 5 min, descartado o sobrenadante e seco por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 40 µL de água nuclease free e armazenado a -80°C (ZHANG et al., 2020).

As amostras foram tratadas com DNase de acordo com o protocolo do kit TURBO™ DNase Invitrogen. Inicialmente, 17 µL do RNA obtido das extrações foram

adicionados juntamente com 2 μL de tampão buffer 10 \times e 1 μL de DNase, e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida, adicionado 2 μL de tampão inativador, centrifugado a 2000 $\times g$ por 5 minutos e armazenado a -80 $^{\circ}\text{C}$.

Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase(RT-PCR) e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanovue após tratamento e a concentração ajustada para 50ng/ μL . Com as concentrações das amostras igualadas, foi iniciado o processo de RT-PCR, no qual a transcriptase reversa converte o RNA em DNA (ZHANG et al., 2020). O RNA foi submetido à síntese do cDNA utilizando o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (ThermoFisher).

Em um microtubo de 200 μL , foram adicionados 10 μL de RNA total e incubado a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos. Em seguida, o tubo foi transferido para um recipiente com gelo e adicionados 2,0 μL de tampão 10x RT, 0,8 μL dNTP (100 mM), 2,0 μL de iniciadores randômicos, 1,0 μL da enzima Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50 U/ μL) e 4,2 μL de água livre de nucleases. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, 37 $^{\circ}\text{C}$ por 120 minutos, 85 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, e mantidas em 4 $^{\circ}\text{C}$ até retirada do termociclador. O controle positivo foi obtido por meio da reação de transcrição reversa de 1,0 μL da solução de dsRNA (500 ng/ μL) utilizada no tratamento das amostras de solo.

Para a realização da reação de qPCR, foi utilizado o kit SYBR™ Select Master Mix (ThermoFisher), em que 1 μL de cDNA foi adicionado em um volume final de 15 μL , contendo 10 mM de cada primer (GFP R4/F4), 7,5 μL do master Mix 2x e 4,5 μL de água livre de nucleases. As amostras foram submetidas a 40 ciclos de amplificação, consistindo em uma desnaturação a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, seguida de um ciclo de extensão a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto. A análise da curva de dissociação foi realizada entre 72 e 95 $^{\circ}\text{C}$. O equipamento utilizado foi o 7500 *Fast Real-Time PCR System*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento e disponibilização de produtos à base de dsRNA para uso agrícola levantam preocupações sobre o acúmulo dessas moléculas no ambiente e os possíveis danos ambientais. Os solos desempenham um papel importante no acúmulo de produtos aplicados em ambientes agrícolas, seja através da lavagem dos produtos nas partes aéreas das plantas ou da adição direta no solo. O desenvolvimento de uma metodologia para detectar e monitorar o acúmulo e a degradação de dsRNA no solo é crucial para avaliar os riscos e impactos ambientais desses produtos agrícolas.

A escolha na utilização tanto da quitosana quanto da HDL como componentes das nanopartículas para a proteção do dsRNA no estudo baseia-se em suas propriedades únicas e complementares. A quitosana é um polímero natural derivado da quitina, encontrado em crustáceos, como camarões e caranguejos (COSTA e SILVA et al., 2006). Ela possui propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicas, o que a torna uma opção atrativa para a encapsulação de moléculas bioativas, como o dsRNA (GURUSAMY et al., 2020). Além disso, a quitosana apresenta carga positiva, o que favorece a sua interação com o dsRNA, que é negativamente carregado, promovendo a formação de complexos estáveis (KOLGE et al., 2023).

A utilização da HDL como componente das nanopartículas confere estabilidade e proteção ao dsRNA, protegendo-o contra a degradação enzimática e aumentando sua vida útil no ambiente. Além disso, a presença da HDL na superfície das nanopartículas pode facilitar a internalização dessas partículas pelas células vegetais, permitindo uma maior eficiência na entrega do dsRNA (KUAI et al., 2016). A utilização das nanopartículas de quitosana e HDL proporciona proteção eficiente ao dsRNA, preservando sua integridade durante a análise por qPCR.

A qPCR é uma ferramenta fundamental para a quantificação de ácidos nucleicos em estudos de biologia molecular, caracterizada por ser altamente sensível e precisa (BUSTIN, 2005). Neste trabalho, a qPCR foi essencial para monitorar a presença do dsRNA no solo ao longo do tempo, e avaliar a eficácia dos diferentes tratamentos. Através da análise dos valores de Ct (*Cycling Threshold*), estabelecidos em 0.6 (limite comumente usado para definir o ponto de detecção), foi possível determinar qual formulação resultou em maior acúmulo de dsRNA no solo, contribuindo para a compreensão do comportamento dessas nanopartículas.

Os resultados obtidos foram representados em três gráficos distintos, devido ao número de amostras utilizadas na qPCR. Cada amostra foi analisada em duplicata para

garantir a precisão dos resultados. Na Figura 2 (A, B e C) é possível observar a amplificação das amostras de 24 a 192 horas, 216 a 360 horas, 552 a 1440 horas, respectivamente.

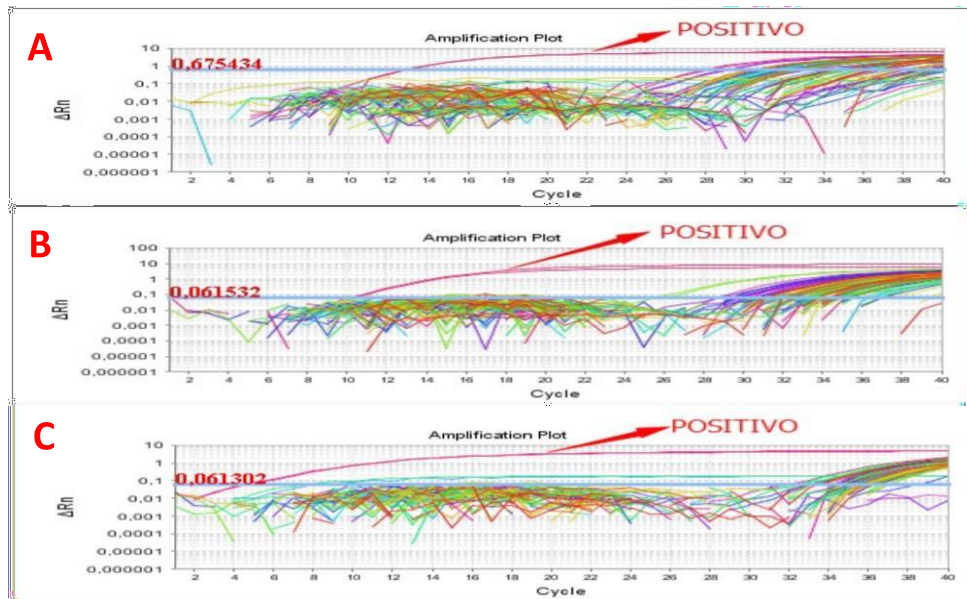


FIGURA 2 Curva de amplificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) das amostras de 0 a 192 horas (A), 216 a 360 horas (B) e 552 a 1440 horas (C). Ciclo valores limiar (Ct) 0.6 em função de log (10) do número de cópias (Δ RN). Positivo (RNA puro).

O gráfico gerado permite visualizar a relação entre a quantidade de produtos amplificados e o número de ciclos de amplificação. Na fase inicial da amplificação, a curva das amostras do tratamento é quase plana, devido à baixa quantidade de produtos amplificados. A curva do controle positivo é rapidamente amplificada devido a quantidade de material contida na amostra. Conforme a amplificação avança, a quantidade de produtos cresce exponencialmente e a curva apresenta um aumento abrupto, atingindo um patamar no final da amplificação.

Essa curva é utilizada para determinar o Ct, que representa o número de ciclos de amplificação necessários para atingir um limiar de detecção pré-determinado, com base em critérios específicos, os quais podem variar dependendo do protocolo e dos instrumentos utilizados. Quanto menor o valor de Ct, maior é a quantidade de transcritos do gene-alvo na amostra (TANG; STRATTON, 2006).

A partir do gráfico, é possível realizar uma análise da expressão das amostras por meio da fluorescência. Os dados também podem ser analisados de forma independente

como mostra a Figura 3. Além disso, esses dados podem ser expostos em números, facilitando a compreensão dos resultados.

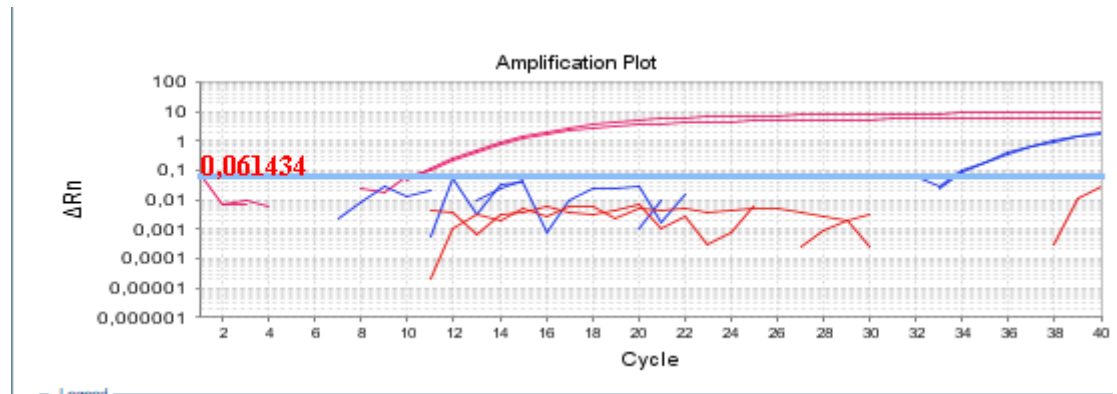


FIGURA 3 - Curva de amplificação da amostra de 264 horas (azul), controle positivo (rosa) e branco (vermelho) em relação a linha Threshold (Ct).

Na Figura 4 é possível observar os resultados expressos no gráfico. As amostras de dsRNA puro, amostras complexadas em HDL e amostras em Quitosana respectivamente.

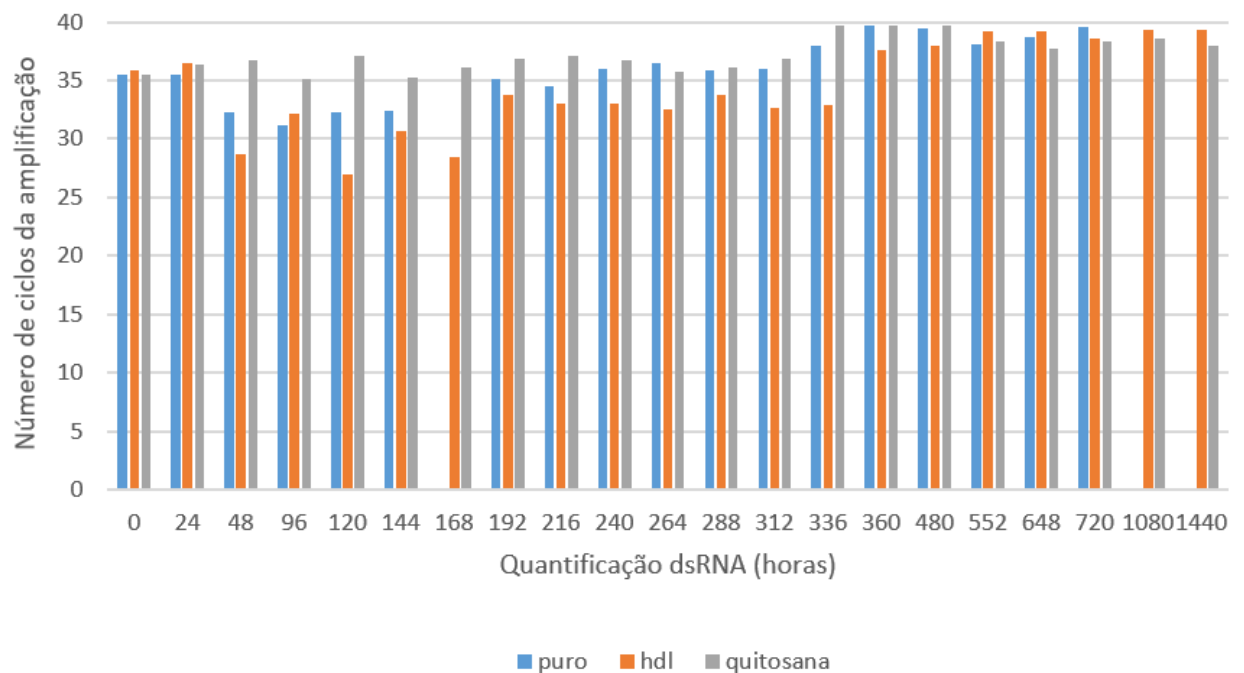


FIGURA 4 Comparação do Ct (número de ciclos) de dsRNA em amostras de dsRNA puro,

encapsulado em HDL, e quitosana até 1440h.

Os dados do experimento foram obtidos a partir do gráfico gerado pelo programa *7500Fast Real-Time PCR System* (Figura 3). O parâmetro utilizado foi o valor do Ct médio das duplicatas. O limite de detecção foi determinado abaixo de 37, pois valores de Ct acima de 37 podem indicar uma quantidade muito baixa do alvo presente na amostra ou uma amplificação não específica, o que pode levar a resultados menos confiáveis, recomendação padrão em muitos protocolos e manuais de fabricantes de kits de qPCR (BUSTIN, 2005). O período máximo de permanência do dsRNA no solo foi definido como aquele que o dsRNA fosse detectado nos dois tubos do tratamento.

As amostras do dsRNA puro, apresentaram um limite de detecção no período de 312 horas, com um Ct de médio de 35,57. O tratamento com HDL apresentou limite de detecção no intervalo de 336 horas, com Ct médio de 34,62. O tratamento com quitosana apresentou limite de detecção no intervalo de 312 horas, com Ct médio de 36,14.

É importante mencionar que, a cada ciclo de qPCR, ocorre a amplificação exponencial do material genético presente na amostra, resultando no dobro da quantidade de material genético a cada ciclo. Portanto, quanto menor o Ct (*Cycling Threshold*), maior a quantidade de material genético presente na amostra. Dessa forma, o fato do tratamento com HDL apresentar um Ct médio menor do que os outros tratamentos, indica uma maior concentração de material genético na amostra tratada com HDL em comparação com os outros tratamentos.

Essa diferença na expressão entre os tratamentos é de relevância significativa, pois sugere que o tratamento com HDL pode ter um efeito de amplificação ou aumento da quantidade de material genético presente nas amostras. Isso pode ser importante em termos de aplicação prática, pois uma maior concentração de material genético pode influenciar a eficácia de determinados processos ou experimentos relacionados ao estudo ou manipulação dessas moléculas.

A degradação rápida do dsRNA no solo pode ser um desafio, pois limita sua eficácia como agente de controle biológico ou como ferramenta de modificação genética. Ao prolongar a persistência do dsRNA no solo, o tratamento com HDL pode oferecer vantagens importantes. Por exemplo, em relação ao controle de pragas ou doenças, uma maior duração do dsRNA no solo permite que ele permaneça ativo por um período mais longo, aumentando assim a eficácia do tratamento ao longo do tempo. Isso é

particularmente benéfico em sistemas agrícolas nos quais a proteção contínua contra pragas ou patógenos é necessária.

Além disso, no caso de utilização do dsRNA para fins de modificação genética, uma maior persistência no solo pode favorecer a efetiva incorporação do material genético nas plantas-alvo. Isso pode resultar em uma expressão prolongada do traço desejado, o que, por sua vez, potencializa o impacto da característica que está sendo modificada.

A capacidade do tratamento com dsRNA em combinação com HDL de prolongar a sua persistência no solo pode ter implicações econômicas significativas. Uma maior duração do tratamento reduz a necessidade de reaplicações frequentes do dsRNA, resultando em potenciais economias de custo associadas à compra e aplicação repetida do produto. Isso pode tornar o tratamento com dsRNA mais vantajoso em termos de custo-benefício, tornando-o uma opção mais acessível e viável para aplicações agrícolas em longo prazo.

No entanto, é fundamental considerar também os potenciais efeitos colaterais e impactos ambientais decorrentes do prolongamento da presença do dsRNA no solo através de um tratamento de maior duração. É necessário conduzir estudos adicionais para avaliar a segurança desse tratamento e investigar possíveis efeitos não intencionais que possam surgir devido à presença prolongada do dsRNA no ambiente. Essas análises são cruciais para garantir que o tratamento seja ambientalmente seguro e não cause efeitos adversos indesejados em organismos não alvo e nos ecossistemas em geral.

Resultados com 0 ciclos na qPCR podem indicar ausência ou baixa concentração do alvo de interesse na amostra. Essa falta de amplificação pode ser devido à baixa quantidade do alvo, problemas na extração do material genético, falhas nos primers ou sondas utilizadas, ou presença de inibidores na reação. (CAMARGO; SILVA, 2007).

Para avaliar se houve contaminação, foi necessário analisar a curva de dissociação, Figura 4, técnica complementar à qPCR. A curva de dissociação é avaliada analisando o gráfico gerado durante o aquecimento gradual do produto de amplificação. A separação das duas fitas de DNA nesse processo permite a detecção de produtos inespecíficos ou contaminações. A presença de picos adicionais ou anômalos na curva indica possíveis contaminações ou produtos não específicos (Santos; Santos, 2014).

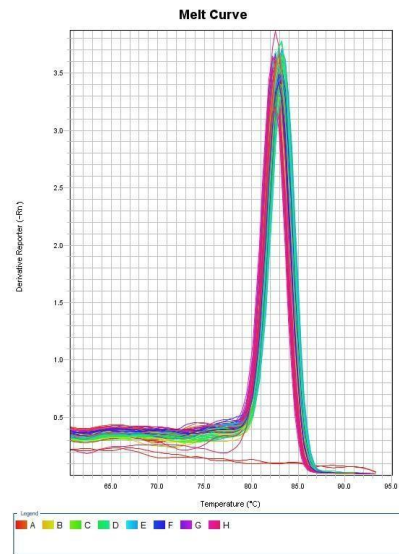


FIGURA 5 - Curva de dissociação padrão obtida por qPCR, com relação linear entre a fluorescência e a temperatura de fusão das duplas fitas.

A partir da análise dos valores de Ct médio, citados anteriormente, foi possível inferir que a quantidade de dsRNA no solo foi maior e mais duradoura no tratamento com HDL (336h). A complexação do dsRNA em HDL permitiu uma maior permanência no solo, enquanto o encapsulamento em quitosana não alterou o tempo de permanência do dsRNA no solo.

A utilização do dsRNA complexado com HDL demonstrou ser altamente vantajosa devido a diversos fatores. Primeiramente, o trabalho evidenciou uma maior viabilidade além de maior acúmulo do dsRNA no solo quando encapsulado em HDL, em comparação com outras formulações. Isso refletiu nos resultados de qPCR, onde foi observado que os valores de Ct estavam significativamente mais baixos em determinados períodos, indicando uma maior quantidade de dsRNA presente no solo.

Em um estudo de Dubelman et al. (2014), foi observada uma permanência máxima de 36 horas para o dsRNA puro no solo após a aplicação, enquanto Zhang et al. (2020) detectaram moléculas de dsRNA puro até 72 horas após a aplicação no solo. No entanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem uma diferença significativa, indicando que o dsRNA pode permanecer no solo por um período ainda mais longo, chegando a até 312 horas (aproximadamente 13 dias).

Essa diferença substancial na persistência do dsRNA no solo é de extrema relevância e valoriza os resultados deste estudo. Ao superar em mais de dez vezes a duração observada nos estudos anteriores, os dados obtidos fornecem evidências

promissoras para o uso prático e efetivo do dsRNA no controle de pragas, doenças ou na modificação genética de plantas. A capacidade de prolongar a presença do dsRNA no solo por um período tão prolongado pode ter implicações significativas, permitindo uma ação mais duradoura e eficiente do dsRNA.

Essa descoberta é especialmente relevante no contexto agrícola, onde a necessidade de tratamentos menos frequentes pode resultar em economia de recursos, tempo e custos associados à aplicação repetida de dsRNA. Além disso, um tempo de permanência prolongado no solo oferece uma maior janela de ação para que o dsRNA exerça seus efeitos desejados, aumentando assim a probabilidade de sucesso no controle de pragas ou doenças, ou na expressão prolongada de características modificadas geneticamente. Os resultados promissores deste estudo proporcionam uma base sólida para a continuação da pesquisa e o desenvolvimento de aplicações agrícolas mais eficazes e sustentáveis envolvendo o dsRNA.

O método de detecção utilizado no atual trabalho, foi o mesmo apresentado por Zhang et al (2020) (RT-qPCR), diferentemente do método QuantiGene 2.0 (QGP) empregado no estudo de Dubelman e colaboradores (2014). Wang et al. (2016) realizaram uma comparação entre os métodos QuantiGene 2.0 (QGP) e RT-qPCR em plantas geneticamente modificadas por RNAi, e os resultados indicaram que ambos os métodos são adequados para quantificar moléculas de dsRNA nesse tipo de planta. Portanto, a diferença no tempo de permanência do dsRNA no solo encontrado em ambos os estudos, em comparação ao atual trabalho, pode estar relacionada ao desenho experimental adotado em cada um dos estudos.

Nos estudos mencionados, as amostras de solo coletadas foram submetidas a processamentos adicionais, incluindo separação de detritos, secagem e armazenamento em temperatura ambiente ou refrigerada antes da análise. No entanto, no presente estudo, o solo coletado foi utilizado imediatamente e não passou por processamentos adicionais além da pesagem e aplicação do dsRNA.

Os métodos de preparo e incubação da solução de dsRNA utilizados nos diferentes estudos são distintos. Enquanto Dubelman et al. (2014) utilizaram uma solução contendo massa vegetal e tampão PBST, Zhang et al. (2020) utilizou tampão de ácido propano sulfônico e NaCl e manteve as amostras em um rotor com temperatura controlada. Neste estudo, optou-se por diluir a solução de dsRNA em água livre de nucleases para obter a concentração e volume desejados. Diferentemente dos outros estudos que utilizaram ácidos ou tampões para a ressuspensão das amostras aplicadas ao solo, a escolha de utilizar

água como solvente neste trabalho evitou a introdução de compostos ácidos e potencialmente tóxicos.

Essa abordagem simplificada e livre de aditivos adicionais, como ácidos ou tampões, pode ter contribuído para a maior estabilidade e persistência observada do dsRNA no solo. Além disso, a utilização de água como solvente é uma prática mais econômica e acessível, facilitando a reprodução e a aplicação prática dessa metodologia em estudos futuros.

Comparando com estudos anteriores, o presente trabalho apresenta uma abordagem diferente quanto ao tipo de solo utilizado e ao tampão empregado na filtração do solo. Enquanto Dubelman et al. (2014) e Zhang et al. (2020) utilizaram solos com características diferentes e tampões com pH mais alcalinos. O presente trabalho testou um solo franco argilo-arenoso e utilizou um tampão com pH 7.

As diferenças nos resultados sobre a degradação do dsRNA no solo podem ser explicadas pelas abordagens metodológicas adotadas em cada estudo. Cada pesquisa utilizou técnicas e condições experimentais distintas, incluindo etapas adicionais na coleta das amostras, diferentes métodos de preparo e incubação, uso de diferentes soluções de dsRNA, entre outros parâmetros. Essas variáveis podem ter influenciado os resultados, destacando a importância de considerar cuidadosamente os protocolos experimentais ao avaliar a estabilidade do dsRNA no solo.

A ausência de processamentos adicionais pode ter contribuído para a maior permanência do dsRNA no solo observada neste estudo em comparação com os estudos mencionados. O uso imediato do solo coletado minimiza a exposição do dsRNA a condições ambientais variáveis e a possíveis degradações decorrentes dos processamentos, como separação de detritos, secagem e armazenamento.

É importante considerar que a realização de processamentos adicionais nos solos deste estudo, como nos estudos anteriores, poderia ter influenciado a persistência do dsRNA, reduzindo seu tempo de permanência. No entanto, é relevante destacar que a decisão de não realizar esses processamentos adicionais foi intencional, com o objetivo de investigar a estabilidade natural do dsRNA no solo.

Um estudo realizado por Fischer et al. (2016) apresentou evidências de que dsRNAs (RNA de fita dupla) com diferentes tamanhos, estruturas e sequências são degradados rapidamente no solo, seguindo uma cinética semelhante. Essa descoberta é relevante para o contexto deste trabalho, uma vez que a metodologia proposta utiliza um método semelhante para extrair e quantificar dsRNA em solos naturais.

Considerando os resultados obtidos, pode-se argumentar que a abordagem adotada neste estudo, de utilizar o solo imediatamente sem processamentos adicionais, permitiu uma maior permanência do dsRNA no solo. Essa abordagem pode ser vista como uma estratégia mais prática e eficiente, evitando etapas adicionais que podem influenciar negativamente a persistência do dsRNA no solo.

Os resultados obtidos ressaltam a necessidade de escolher com cautela a metodologia adequada ao investigar a estabilidade e eficácia do dsRNA em aplicações agrícolas, representando um avanço importante no desenvolvimento de estratégias mais eficientes e seguras para a aplicação do dsRNA na agricultura, com a capacidade de proteger e estabilizar o dsRNA no solo por períodos prolongados. É possível melhorar a proteção das plantas contrapragas e doenças, reduzindo a necessidade do uso de pesticidas químicos nocivos ao meio ambiente.

O uso de dsRNA complexado com nanopartículas é uma abordagem altamente promissora para o controle de pragas e doenças na agricultura. Essa estratégia envolve a proteção do dsRNA contra a degradação enzimática e a entrega direcionada aos organismos-alvo, proporcionando que o dsRNA permaneça ativo por mais tempo, e maior eficácia no silenciamento gênico (YANG et al., 2022).

Whitfield et al. (2018) observaram que a formação de uma estrutura polimérica catiônica-dsRNA utilizando um polímero catiônico resultou em maior resistência à degradação do dsRNA em comparação com o dsRNA livre. Esse achado destaca a importância de estratégias de proteção para garantir a estabilidade do dsRNA no solo. Além disso, Burgevin (2021) investigou a proteção do dsRNA no solo por meio do uso de copolímeros hidrolisáveis DMAEA e DMAEMA. O estudo examinou como a composição e arquitetura desses copolímeros influenciaram a eficácia da proteção do dsRNA. Os resultados revelaram que a adição dos copolímeros hidrolisáveis ao dsRNA promoveu significativamente a estabilidade do dsRNA no solo, prolongando assim sua vida útil.

Ao considerar os resultados desses dois estudos, observamos uma convergência de evidências que destacam a relevância da proteção do dsRNA no solo. Tanto o uso de copolímeros hidrolisáveis quanto a encapsulação em nanopartículas compostas por quitosana e HDL apresentadas no atual trabalho, apresentam estratégias promissoras para prolongar a estabilidade do dsRNA, contribuindo para sua aplicação eficaz como agente de controle de fitopatógenos.

Entretanto, é necessária uma avaliação das vantagens e desvantagens do encapsulamento com HDL, é essencial a consideração de alguns aspectos. O uso de

nanopartículas compostas por HDL oferece benefícios significativos. No entanto, é fundamental também examinar os desafios e limitações associados ao processo de encapsulamento, como o custo envolvido na produção das nanopartículas e a disponibilidade dos materiais necessários. Essas nanopartículas conferem estabilidade ao dsRNA, protegendo-o da degradação no solo, e facilitam sua penetração nos tecidos vegetais. Além disso, a encapsulação em nanopartículas reduz a exposição ambiental, minimizando possíveis efeitos adversos em organismos não alvo (PADRICELLO 2020; YANG et al., 2022)

DEVOS et al., 2019 descobriu que o RNA de fita dupla (dsRNA) aplicado em plantas é rapidamente degradado e não se acumula nos tecidos vegetais. Além disso, o estudo mostrou que o dsRNA não afeta negativamente o crescimento ou desenvolvimento das plantas testadas. Isso indica que o dsRNA não representa um risco significativo para a saúde das plantas ou a segurança alimentar. No entanto, a avaliação completa da segurança ambiental e alimentar de organismos geneticamente modificados requer uma análise abrangente de riscos potenciais e benefícios, incluindo possíveis efeitos na saúde humana e animal, bem como segurança alimentar.

O custo envolvido na produção das nanopartículas de HDL pode variar dependendo dos métodos e tecnologias utilizadas, incluindo a síntese dos materiais, a purificação e o processo de encapsulamento. Além disso, a disponibilidade dos materiais necessários para a produção das nanopartículas também pode afetar o custo e a viabilidade dessa abordagem. Esses aspectos devem ser cuidadosamente considerados ao avaliar a implementação em larga escala do uso de nanopartículas de HDL para o encapsulamento do dsRNA em aplicações agrícolas. Além disso, é crucial considerar a viabilidade econômica dessa abordagem, bem como possíveis impactos ambientais, a fim de avaliar sua aplicabilidade e adoção da metodologia.

4 CONCLUSÃO

A utilização de dsRNA com nanopartículas, aplicados ao solo, pode ser uma ferramenta valiosa para a proteção e entrega eficiente de dsRNA em plantas. A complexação com HDL não apenas aumentou a permanência do dsRNA no solo, como possibilitou um maior acúmulo, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de produtos contendo dsRNA para aplicação

via solo. Essas descobertas fornecem insights importantes para a melhoria da eficiência e eficácia do uso de dsRNA em aplicações agrícolas e ambientais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENEDIK, M. J.; STRYCH, U. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. **FEMSMicrobiology Letters**, v. 165, n. 1, p. 1–13, 1998.

BLUM, S. A. E.; LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 513–521, 1997.

BORCHARDT, M. A. et al. The environmental microbiology minimum information (EMMI) guidelines: qPCR and dPCR quality and reporting for environmental microbiology. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 15, p. 10210–10223, 2021.

BURGEVIN, F. **Copolymers for DsRNA Protection in Soil: Influence of Composition and Architecture**. Department of Chemistry: University of Warwick, 2021.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

BUSTIN, S. A. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 4, p. 493–498, 2005.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005.

CAMARGO, Cleyton F.; SILVA, Paulo R. Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 4, p. 197-203, 2007

CASTELLANOS, N. L. et al. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*: Oral RNAi-caused mortality in *Euschistus heros*. **Pest ManagementS**, v. 75, n. 2, p. 537–548, 2019.

COSTA E SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 774–784, 2006.

CUNNINGHAM, F. J. et al. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 882–897, 2018.

DEVOS, Y. et al. Environmental fate and dissipation of applied dsRNA in soil, aquatic systems, and plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 21, 2019.

DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PloSone**, v. 9, n. 3, p. e93155, 2014.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p. 1421- 1431, 2006.

FISCHER, J. R. et al. Characterizing a novel and sensitive method to measure dsRNA in soil. **Chemosphere**, v. 161, p. 319–324, 2016.

FINKEL, S. E.; KOLTER, R. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6288–6293, 2001.

FISCHER, J. R. et al. Characterizing a novel and sensitive method to measure dsRNA in soil. **Chemosphere**, v. 161, p. 319–324, 2016.

FLETCHER, S. J. et al. A perspective on RNAi-based biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 51, 2020.

GHAG, S.B. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 242-254, 2017.

GEBREMICHAEL, D.E., HAILE, Z.M., Negrini, F., Sabbadini, S., Capriotti, L., Mezzetti, B. e Baraldi, E. (2021). RNA Interference Strategies for Future Management of Plant Pathogenic Fungi: **Prospects and Challenges**. **Plants**, 10(4), 650.

GREAVES, M. P.; WILSON, M. J. The degradation of nucleic acids and montmorillonite-nucleic-acid complexes by soil microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 2, n. 4, p. 257–268, 1970.

GULDEN, R. H. et al. Quantitation of transgenic plant DNA in leachate water: real-time polymerase chain reaction analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5858–5865, 2005.

GURUSAMY, D.; MOGILICHERLA, K.; PALLI, S.R. Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 4, e21677, 2020

JOGA, M. R. et al. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 553, 2016.

KEOWN, H.; O'CALLAGHAN, M.; GREENFIELD, L. G. Decomposição de ácidos nucleicos no solo. **New Zealand Natural Sciences**, v. 29, p. 13-19, 2004.

KOCH, A.; KOGEL, K.-H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, p. 821–831, 2014.

KOLGE, H.; KADAM, K.; GHORMADE, V. Chitosan nanocarriers mediated dsRNA delivery in gene silencing for *Helicoverpa armigera* biocontrol. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 189, 105292, 2023.

KUAI, R. et al. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 10, n. 3, p. 3015-3041, 2016.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

LEVY-BOOTH, D. J. et al. Real-time polymerase chain reaction monitoring of recombinant DNA entry into soil from decomposing roundup ready leaf biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6339–6347, 2008.

LIN, Y.H.; HUANG, J.H.; LIU, Y.; BELLES, X.; LEE, H.J. Oral delivery of dsRNA lipoplexesto German protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. **Pest Management Science**, v. 73, p. 960-966, 2017.

LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coatprotein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, v. 189, p. 725-733, 1992.

LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M.; DOUGHERTY, W.G.

Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1749- 59, 1993.

MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature plants**, v. 3, p. 16207, 2017a.

MITTER, N. et al. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 49–55, 2017b.

MORRIS, K. V. et al. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5688, p. 1289–1292, 2004.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, supl. 10, p. 10-16, nov. 2010.

NELSON, R. International plant pathology: Past and future contributions to global food security. **Phytopathology**, v. 110, n. 2, p. 245–253, 2020.

PADRICELLO, V. Environmental Fate and Risk Assessment in Soil of RNAi-based biopesticide dsRNA V-ATPase subunit A against small hive beetle *Aethina tumida*. (Tese de doutorado) - **Universidade de Newcastle, Newcastle upon Tyne**, 2020.

RÊGO-MACHADO, C. M. et al. Da cossupressão à tecnologia de RNAi: histórico, mecanismo e exemplos de aplicação tópica de RNA para controle de fitopatógenos. In: ANDRADE, E. C.; SANTIAGO, T. R. (Ed.). **Tecnologia de RNAi: Aplicações e Perspectivas**. Brasília: Embrapa, 2020. p. 125-152.

ROSA, C.; KUO, Y.W.; WURIYANGHAN, H.; FALK, B.W. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 581-610, 2018.

SANTOS, J. R.; SANTOS, M. B. P. T. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de melting. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 46, n. 3, p. 247-252, 2014.

SAVARY, S. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

SOUZA, L. da S.; SOUZA, L. D. Caracterização físico-hídrica de solos da área do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca de Fruticultura Tropical**, 2001

TANG, Y. W.; STRATTON, C. W. Quantitative real-time PCR in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 398-430, 2006.

WAGNER, E. M. Monitoring gene expression: quantitative Real-Time RT-PCR. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1027, p. 19–45, 2013.

WHITFIELD, R. et al. Efficient binding, protection, and self-release of dsRNA in soil by linear and star cationic polymers. **ACS Macro Letters**, v. 7, n. 8, p. 909–915, 2018.

YAN, J. et al. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 2, p. 1831–1838, 2012.

YANG, W. et al. Advances in nanocarriers to improve the stability of dsRNA in the environment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 974646, 2022.

ZHANG, K. et al. Analysis of RNA interference (RNAi) biopesticides: Double-stranded RNA (dsRNA) extraction from agricultural soils and quantification by RT-qPCR. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 8, p. 4893–4902, 2020.

ZOTTI, M. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest management science**, v. 74, n. 6, p. 1239–1250, 2018.