



**VANESSA ALVES GOMES**

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE SEMENTES  
DE MAMÃO TÓXICOS A *Meloidogyne incognita*.**

**LAVRAS-MG  
2018**

**VANESSA ALVES GOMES**

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE SEMENTES DE MAMÃO  
TÓXICOS A *Meloidogyne incognita*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia área de concentração Fitopatologia para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador

Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva  
Co-orientador

Dr. Aline Ferreira Barros  
Co-orientadora

**LAVRAS-MG  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gomes, Vanessa Alves.

Compostos orgânicos voláteis de sementes de mamão tóxicos a  
*Meloidogyne incognita* / Vanessa Alves Gomes. 2018.  
45 p.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Coorientador(a): Júlio Carlos Pereira da Silva, Aline Ferreira  
Barros.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Bioprospecção de moléculas. 3. Composto  
orgânico volátil I. Campos, Vicente Paulo. II. Silva, Júlio Carlos  
Pereira da. III. Barros, Aline Ferreira. IV. Título.

**VANESSA ALVES GOMES**

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE SEMENTES DE MAMÃO  
TÓXICOS A *Meloidogyne incognita***

**TOXICITY OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF PAPAYA SEEDS TO  
*Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia área de concentração Fitopatologia para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de Julho de 2018

Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva

UFLA

Dr. Marcio Pozzobon Pedroso

UFLA

Dr. Everaldo Antônio Lopes

UFV

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador

Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva  
Co-orientador

Dr. Aline Ferreira Barros  
Co-orientadora

**LAVRAS - MG  
2018**

*Aos meus pais por todo apoio e amor ...*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver este sonho, por toda a sabedoria, paciência e perseverança nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Belmiro Dias Gomes e Helenice Maria Alves Gomes, por todo o carinho que sempre recebi de vocês e por toda a confiança depositada em mim. Sou muito grata por cada palavra amiga e por todo o apoio recebido até esta grande conquista.

A minha irmã, Carolina Alves Gomes, obrigada pelos momentos compartilhados e experiências trocadas, por todo o zelo e preocupação que tens comigo.

Aos meus familiares que torceram e rezaram por mim nos momentos importantes de minha vida.

Ao professor Everaldo Antônio Lopes que me abriu as portas para a Fitopatologia e me trouxe ensinamentos e experiências grandiosas na minha graduação na UFV-CRP.

Ao professor Vicente Paulo Campos que me possibilitou continuar no caminho da Fitopatologia no mestrado na UFLA elevando ainda mais meus conhecimentos e me orientando sempre com muito carinho.

Ao co-orientador Júlio Carlos Pereira da Silva que sempre me acompanhou no decorrer do experimento, contribuindo com sugestões durante a realização dos experimentos e com ensinamentos na estatística.

A co-orientadora Aline Ferreira Barros que também me acompanhou no decorrer dos experimentos contribuindo com meus trabalhos.

Aos integrantes do Laboratório de Nematologia, técnicos, funcionários, estagiários, colegas e amigos pela ajuda no desenvolvimento de minhas pesquisas e pelos momentos compartilhados.

A todo o Departamento de Fitopatologia (DFP), professores, técnicos, funcionários e aos amigos que caminharam comigo.

Aos demais departamentos, professores e funcionários que contribuíram para a realização do meu trabalho. Em especial ao Marcio Pozzobon Pedroso e ao Departamento de Química, bem como a Rosane do DBI que me ajudou com as análises cromatográficas.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que conquistei aqui em Lavras que fizeram estes dois anos passarem voando, sempre presentes me dando força e preenchendo o vazio de morar longe de casa.

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e a aquisição desta conquista.

A todos vocês o meu muito obrigada!

## RESUMO

Os compostos voláteis emitidos por plantas podem ter atividade nematicida. Neste trabalho, voláteis emitidos por macerados de sementes de mamão (*Carica papaya*) foram testados contra juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* empregando-se a técnica desenvolvida com tubo Supelco. Foram testados diferentes tempos de exposição dos J2 aos compostos orgânicos voláteis (COVs) das sementes 1,5; 3; 6; 12; 24; 48 h. Após a exposição aos COVs por 48 h houve 100% de mortalidade. Os J2 expostos aos COVs foram inoculados em tomateiros avaliando-se infectividade e reprodução. A redução de galhas começou a partir do tempo de 6 h, chegando a uma redução total no tempo de 48 h. Já nos ovos, os valores foram inferiores a 20% a partir do tempo 6 h chegando a zero no tempo de 48h, quando comparados com a testemunha. A biofumigação de substrato misturado com macerado de sementes e ovos de *M. incognita* também foi estudada, bem como a toxicidade nos ovos injetados em tubos endorff colocados na superfície da mistura ovos, substrato e macerado, onde é formado uma câmara de gás pela vedação da superfície com filme plástico. Foram utilizados diferentes quantidades do macerado de sementes de mamão 0, 1, 2, 4 e 8 g. Desta forma, foram avaliados a infectividade e reprodução após 40 dias após avaliando o número de galhas e de ovos por sistema radicular. Houve redução de 90% de galhas a partir de 4g e de mais de 90% nos ovos a partir de 2 g. Tanto para galhas quanto em ovos a redução foi de 100% em 8 g. Também foi estudada a toxicidade da água exposta aos COVs da semente de mamão aos J2 de *M. incognita*. Os tubos foram abertos após diferentes tempos de exposição do nematoide à água tóxica e avaliado o número de J2 móveis e imóveis e mortos. A identificação de COVs emitidos pelas plantas foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Das 17 moléculas encontradas foram testadas quanto à toxicidade a *M. incognita*. Testes in vitro das moléculas acetato de vinila, fenilacetaldéido e benzilacetoneitrila mostraram sua eficiência no controle de nematoides, as quais apresentaram CL 50 de 61 µg / mL, 103 µg / mL e 15 µg / mL respectivamente.

**Palavras-chave:** Nematóide das galhas. Biofumigação. Nematicidas orgânicos. Bioprospecção. Cromatografia gasosa.

## ABSTRACT

Volatiles organic compounds (VOCs) emitted from many plant species are toxic to plant-parasitic nematodes. Thus, this work aimed to verify the activity of papaya (*Carica papaya*) seeds VOCs against *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J2) by Supelco tubes technique. The J2 were exposed to VOCs for different exposure time (1.5, 3, 6, 12, 24, 48 h). After 48 h of exposure the J2 mortality reach 100%. The rest of J2 were applied around tomato roots to evaluate the infectivity and reproduction of exposed J2. From 6 h exposure the infectivity decreased 80% and eggs decreased more than 90%. Both infectivity and reproduction were completely reduced after 48 h exposure. We also verified the effect of papaya seed incorporated into artificial substrate by biofumigation at greenhouse. Over the incorporated substrate a microtube were half buried where J2 were incubated inside. Different amounts of papaya seed were incorporated: 0, 1, 2, 4 e 8 g along with *M. incognita* eggs. After 40 days of planting tomato seedlings the infectivity and reproduction were estimated from the roots and the mortality was verified from J2 inside the microtubes. From 4 g of papaya seed incorporation the infectivity decreased by 90% while the reproduction decreased more than 90%. By applying 100 % reduction on infectivity and reproduction were reached. When the water was exposed to VOCs of papaya seeds no activity was verified against *M. incognita* J2. Furthermore, 17 compounds were identified from papaya seeds volatilome by gas chromatography (GC/MS). From the volatilome the compounds vinyl acetate, phenylacetaldehyde and benzoylacetonitrile were selected to follow in vitro analyses against *M. incognita*. Acetato de vinila, fenilacetaldeído and benzilacetonitrila killed the *M. incognita* J2 with lethal concentrations of (LC50) of 61 µg / mL, 103 µg / mL e 15 µg / mL respectively.

**Keywords:** Root-knot nematodes. Biofumigation Biological prospection. Plant volatilome. Nematicidal compounds.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Referencial Teórico.....	2
2.1. <i>Meloidogyne incognita</i> no Brasil.....	2
2.2. Controle de fitonematoides com plantas.....	3
2.3. Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) tóxicos a fitonematoides.....	6
2.4. Semente de mamão no controle de fitonematoides.....	8
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	9
3.2. Compostos voláteis de macerados de sementes de mamão.....	9
3.3. Infectividade e reprodução de J2 de <i>M. incognita</i> .....	10
3.4. Biofumigação com macerado de sementes de mamão.....	11
3.5. Toxicidade da água exposta aos voláteis emitidos pelas sementes de mamão maceradas.....	12
3.6. Infectividade e reprodução dos J2 expostos a água da câmara de gás contendo macerado de sementes de mamão.....	12
3.7. Análise de COVs emitidos pelas sementes de mamão por cromatografia gasosa.....	13
3.8. Toxicidade de moléculas encontradas nas emissões gasosas pelo GC-MS.....	14
3.9. Análise estatística dos dados.....	15
4. Resultados.....	15
4.1. Tempo de exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. incognita</i> aos voláteis.....	15
4.2. Infectividade e Reprodução de J2 de <i>M. incognita</i> .....	17
4.3. Biofumigação com macerado de sementes de mamão.....	18

<b>4.4. Toxicidade da água aos voláteis emitidos pelas sementes de mamão maceradas in vitro e in vivo.....</b>	<b>20</b>
<b>4.5. Análise de COVs emitidos pelas sementes de mamão por cromatografia gasosa.....</b>	<b>20</b>
<b>4.6. Toxicidade de moléculas encontradas nas emissões gasosas pelo GC-MS..</b>	<b>21</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Agradecimentos.....</b>	<b>24</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>25</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O setor agrícola é fundamental no processo de produção de alimentos e geração de empregos. Desta forma, todos os fatores limitantes à produção agrícola devem ser minimizados, para garantir o suprimento de alimentos e contribuir para a economia das nações. Os fitonematoides figuram entre um dos principais fatores limitantes ao cultivo agrícola, principalmente em regiões tropicais e subtropicais.

Outro quesito que contribui para o aumento dos danos causados por estes patógenos encontram-se características de solo arenoso e irrigado. Dentre os setores afetados por nematoides, destacam-se as hortaliças, culturas de exportação como soja, milho, café, algodão, cana-de-açúcar e até mesmo pastagem. Tudo vai depender das condições ambientais, do solo e da instalação da cultura.

O manejo de fitonematoides é difícil, tornando um desafio reduzir seus prejuízos, afetando a produção mundial de alimentos. Uma das soluções eficazes para controle de doenças no geral é o controle químico o que tem sido amplamente empregado. Porém a maioria dos produtos nematicidas registrados são altamente tóxicos. Por conseguinte, o uso de nematicidas está sendo muito questionado, no intuito de minimizar contaminações de indivíduos não alvos. Moléculas menos tóxicas ao homem e ao meio ambiente com atividade nematicidas precisam ser encontradas e disponibilizadas aos produtores.

Enquanto novas moléculas com menor toxicidade e eficazes no controle de fitonematoides não chegam ao mercado, estudos intensificam-se com o uso de plantas como medida de controle. As plantas possuem inúmeros compostos formados por rotas metabólicas específicas e, a partir disso, surge a possibilidade de alguns deles apresentarem efeitos tóxicos quando testados em nematoides. Os testes podem envolver plantas antagônicas, rotação ou sequenciamento de culturas, plantio intercalar, aplicação de tortas ou extratos vegetais, (aquoso ou seco de raiz, fruto, semente, folha, galho, dentre outros), biofumigação com resíduos vegetais (isolado ou associado com cobertura plástica), dentre outros. Tem-se também estudado óleos essenciais obtidos de diferentes partes vegetais no controle de fitonematoides. Somam-se também os estudos de substâncias químicas de metabolismo secundário com os compostos orgânicos voláteis (COVs).

Além das plantas, os COVs são produzidos também por fungos e bactérias e muitos são tóxicos aos nematoides das galhas, o *Meloidogyne* spp. São muitas as plantas e seus órgãos desconhecidas quanto a produção de COVs tóxicos a fitonematoides. Mais desconhecidos ainda são as moléculas que os compõem as quais podem chegar a indústria de pesticidas.

Dentre as diversas plantas e frutos, a semente de mamão tem demonstrado efeito nematicida, porém, ainda não se conhecem as moléculas envolvidas nesta toxicidade. Deste modo, iniciou-se o estudo sobre moléculas voláteis oriundas de sementes de mamão visando o controle de nematoides. Sabe-se que as sementes de mamão possuem diversos outros benefícios como auxiliar no controle de microorganismos no estômago e intestino, além de auxiliar no tratamento de vermes.

Neste trabalho foi avaliado o efeito tóxico de COVs emitidos por sementes de mamão em J2 de a *M. incognita in vitro* e *in vivo*, a retenção em água de moléculas tóxicas, eficácia e produção de voláteis tóxicos pela biofumigação, caracterização das moléculas das emissões e o efeito tóxico isolado de algumas delas a *M. incognita*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Meloidogyne incognita* no Brasil

Grandes prejuízos na produção agrícola têm sido observados em áreas infestadas por vários fitonematoides, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as perdas podem chegar 80% da produção agrícola (NICOL et al., 2011; SIKORA & FERNANDEZ, 2005). Dentre eles estão os nematoides das galhas como as maiores causas (FERRAZ et al., 2010; SASSER & FRECKMAN, 1987; TRUDGILL & BLOK 2001).

As hortaliças estão entre as culturas mais atacadas por este patógeno. Um exemplo é a cultura da cenoura, que sofre deformações nas raízes e pode atingir 100% de perdas na presença de *M. incognita* raça 1 associado com *M. javanica* (CHARCHAR et al., 2000). No caso da soja não é diferente, estima-se que as perdas na produção chegam a 55% em áreas que apresentam este patógeno (MACHADO, 2015). Os danos variam de acordo com as condições ambientais, tipo de solo, densidade do plantio, cultivar utilizado, dentre outros.

Desta forma, o controle desses patógenos é necessário para garantir boas e econômicas produções agrícolas. No entanto, a dificuldade de manejar e controlar os fitonematoides eleva as perdas no campo. Uma das táticas de controle, enfrenta restrições como os nematicidas pelo uso inadequado. A impossibilidade de alcançar um bom controle com uma única medida, tem-se levado a associação de métodos de controle em uma mesma área levando a diminuição da disseminação e redução dos prejuízos (SILVA, 2011).

Dentre os fitonematoides, destaca-se, no Brasil, o gênero *Meloidogyne*. As espécies deste gênero, conhecidos como causadores de galhas em raízes, prejudicam a absorção de água e nutrientes, levando a um menor crescimento da parte aérea e redução na produtividade (ARAUJO et al., 2012). No campo, plantas infectadas demonstram sintomas visuais de amarelecimento e menor crescimento, principalmente em áreas localizadas, reboleiras (CHARCHAR, 1995).

Os danos causados pelos nematoides estão em função da interação entre o ambiente favorável, hospedeiro suscetível e o patógeno agressivo e virulento. Apenas em condições propícias o patógeno se instala, reproduz e causa dano (BERGAMIN FILHO, 1995). Além dos prejuízos causados pelos fitonematoides, individualmente, eles causam nas plantas, porta

de entrada para outros patógenos beneficiando-se de ferimentos principalmente nas raízes (SANTIN, 2008).

## 2.2. Controle de fitonematoides com plantas

A pressão da sociedade por moléculas menos tóxicas e de menor custo, tem levado ao uso de plantas para o controle de fitonematoides. Atualmente, a maioria dos nematicidas existentes e registrados apresenta grande toxicidade, além de persistir no meio ambiente por muito tempo, causando, assim, inúmeros efeitos colaterais tanto em seres humanos como em outros organismos presentes no local de aplicação (SOUSA et al., 2015).

Como as plantas, aparentemente, podem apresentar substâncias que se decompõem em compostos não tóxicos e geralmente não apresentam efeitos nocivos em organismos não-alvo, são indicadas para o controle de fitopatógenos (JARDIM et al., 2017). É conhecido que diversas plantas possuem compostos com atividade antimicrobiana e inseticida, podendo ter ação nematicida (ISMAN, 1999). E algumas delas já são empregadas no campo no controle de fitonematoides. Por exemplo, as plantas antagônicas são comumente usadas no controle de fitonematoides, como em rotação ou sequenciamento de culturas, plantio intercalar, aplicação de tortas ou extratos vegetais, dentre outros. Especificamente, o nim (*Azadirachta indica*), umas das plantas mais estudadas no controle de pragas e nematoides, bem como erva-de-Santa-Maria (*Dysphania ambrosioides*) e mamona (*Ricinus communis*) são empregadas no controle de fitonematoides (BALDIN et al., 2012).

Além disso, diversos produtos naturais, oriundos de partes vegetativas como extratos de raiz, fruto, semente, folha, galho, bem como óleos essenciais obtidos de diferentes espécies vegetais, possuem propriedades nematicidas ou nematostáticas. Novas pesquisas trouxeram a caracterização química dos óleos essenciais e observação de resultados promissores para utilização no controle (GOMMERS, 1981; TERRA et al., 2017).

São vários os relatos de macerados de plantas como mentrasto, bardana, artemísia, losna, confrei, catinga de mulata e melão são caetano que possuem potenciais nematicidas (DIAS et al., 2000). Por exemplo, constatou-se o efeito protetor do extrato aquoso de *Tagetes patula* em tomateiro a *Meloidogyne incognita*. A partir desta descoberta, foram feitos extratos de flores, folhas e raízes, da planta, que inibiram a eclosão e a motilidade, e causaram mortalidade de J2 in vitro. O efeito nematicida mais significativo foi obtido com extrato de raiz de *Tagetes patula* que promoveu a mortalidade de até 68% dos J2. Possivelmente, além

de efeito nematicida e/ou nematostático, pode envolver o aumento da resistência das plantas ao nematoide (FRANZENER et al., 2007).

Extratos aquosos obtidos de Folhas de artemísia (*Chrysanthemum parthenium*), bardana (*Arctium lappa*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), carqueja (*Bacharis trimera*), cavalinha (*Equisetum sp.*), cinamomo (*Melia azedarach*), hortelã (*Mentha sp.*), mamona (*Ricinus communis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), melão-de-São- Caetano (*Momordica charantia*), arruda (*Ruta graveolens*), Falso-boldo (*Coleus barbatus*), confrei (*Symphitum officinalis*), erva-de-bicho (*Polygonum acre*), Feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), Funcho (*Foeniculum vulgare*), guiné (*Petiveria alliacea*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), mucuna-cinza (*Mucuna pruriens*) e nim (*Azadirachta indica*) foram testados contra *Meloidogyne javanica*. Os extratos de hortelã, bardana e mamona reduziram o número de galhas em 75,6%, 65,7% e 54,4%, e o número de ovos em 81,7%, 75,9% e 56,6%, respectivamente (GARDIANO et al., 2009). Outros estudos baseados em extratos de nim e mostarda mostraram-se que ambos emitiram COVs capazes de imobilizar 100% dos J2 e de matar entre 51% e 90% respectivamente. Nos testes da capacidade de infectividade e reprodução, ocorreu redução de galhas nos tratamentos de mostarda na maior concentração (9,6g) de 68,5% e uma redução de ovos no tratamento de mostarda de 69% (4,8g) e 82,5% (9,6g) quando comparado com a testemunha. (BARROS et al., 2014a, 2014b).

Óleos essenciais obtidos de órgãos vegetais têm sido estudados quanto à toxicidade a fitonematoides (OKA et al., 2000; SALGADO et al., 2003). Alguns podem apresentar ação nematicida e nematostática contra patógenos, incluindo fitonematoides, como no caso de plantas medicinais como alfavaca, alecrim pimenta, capim santo, capim citronela, cidreira e eucalipto. Todos esses óleos essenciais afetaram a eclosão ou a sobrevivência dos J2 nas concentrações de 5,0 e 10,0 ml L<sup>-1</sup>, porém, em diluições mais elevadas (<1,25 ml L<sup>-1</sup>), apenas os óleos de alecrim pimenta e capim citronela apresentaram ação nematostática e nematicida, sendo assim, considerados promissores para posteriores ensaios visando o controle desses fitoparasitas no solo (MOREIRA et al., 2009).

Os óleos essenciais contém metabólitos secundários que atuam sozinhos ou sinergicamente contra os fitopatógenos (JARDIM et al., 2017). Assim, os compostos dos óleos essenciais podem atuar diretamente no patógeno, induzir a resistência da planta, ativando seus mecanismos de defesa latente, implicando em mudanças físicas e químicas das plantas e alterando o comportamento enzimático e a produção de fitoalexinas (STEFFEN et

al., 2008). Outra função dos óleos está associada a sua capacidade de atrair ou repelir, estimular ou inibir, os juvenis de segundo estágio (J2) dos fitonematoides (CHITWOOD 2002; FARIA et al., 2016).

As substâncias químicas que compõem os óleos essenciais podem interagir com o patógeno e resultar num composto que altera o seu metabolismo. Nos nematoides, há desorganização celular e algumas funções vitais podem ser inibidas, como desenvolvimento embrionário, mecanismos de movimentação, desestruturação do sistema nervoso e ruptura das membranas celulares alterando sua permeabilidade seletiva (OKA et al., 2000; SALGADO et al., 2003).

Outro aspecto no uso de plantas no controle de fitonematoides é a biofumigação. A incorporação de material vegetal no solo é capaz de conter a multiplicação do patógeno presente. Esta técnica é potencializada pela cobertura do solo com filme plástico, podendo ou não ser adotada. Partindo do princípio que a planta triturada em contato com o solo regride o processo do patógeno na área, surge a necessidade de se estudar os seus compostos. Por exemplo, os efeitos dos macerados de nim e mostarda incorporados ao substrato infestado com ovos de *M. incognita*, resultou em redução linear de galhas a medida que as quantidades de macerado foram aumentadas, mas a redução foi menor do que o controle apenas na quantidade mais alta (9,6 g). Também o número de ovos foi significativamente reduzido em macerados acima ou igual a 2,4 g (BARROS et al., 2014).

Dentre os compostos presentes em áreas incorporadas com vegetais, incluem-se os compostos orgânicos voláteis (COVs) os quais constituem-se de moléculas com até 20 átomos de carbono, com alta pressão de vapor, que atravessam membranas livremente e são liberadas na atmosfera ou solo sem uma barreira de difusão. Muitos COVs são constitutivos nos órgãos vegetais, representando cerca de 1% dos metabólicos secundários existentes (DUDAREVA et al, 2006), mas podem ser produtos da degradação do órgão vegetal por microorganismos como acontece na serapilheira (SILVA, 2010).

### **2.3. Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) tóxicos a fitonematoides**

Estudos envolvendo COVs tóxicos a fitonematoides *in vitro* precisam ser realizados em ambiente fechado para que não haja perda deles para a atmosfera. Esses são formados por várias moléculas a base de carbono, que sob alta pressão de vapor, atravessam membranas e são dispersos rapidamente em soluções aquosas e movimentam-se pela porosidade do solo

(DUDAREVA et al., 2006). O desenvolvimento da técnica com tubo supelco tem sido bastante útil nos estudos com extrato aquoso e seco de diversas plantas (BARROS et al., 2014). Por exemplo, COVs de extratos secos e aquosos de alho inibiram a eclosão de *M. incognita*, sendo o macerado seco mais tóxico (CARLI, 2011).

A presença de COVs é comum na natureza. No solo, pode ser produzido pela microbiota local, como fungos e bactérias (ISIDOROV & JDANOVA, 2002; LEFF & FIERER, 2008; GU et al., 2007; RIGA et al., 2008; HUANG et al., 2010; FREIRE et al., 2012). Em relação as plantas, sabe-se que elas produzem vários compostos conhecidos como metabólicos secundários (PICHERSKY & GANG, 2000), sendo que 1% deles são COVs, tais como terpenoides, fenilpropanoides, benzenoides, derivados de ácidos graxos, derivados de aminoácidos (DUDAREVA & PICHERSKY, 2008). Brassicas produzem isotiocianatos pela degradação dos glucosinolatos (BROWN & MORRA, 2005). O alho tem emissão de alicina (SLUSARENKO et al., 2008). Nim, ervilhas, mostarda, feijão de veludo e feijão de jaque emitem COVs tóxicos a *M. incognita* (BARROS et al., 2014a, b).

A aplicação de torta de algodão no controle de fitonematoides é bem conhecida, porém são poucos os estudos sobre os compostos voláteis envolvidos nos seus efeitos nematicidas. Os COVs que formaram a câmara de gás na superfície da mistura solo mais torta causaram imobilidade dos J2, no período de 10 e 20 dias de formação da câmara, bem como na presença das diversas concentrações de torta. A mortalidade de J2 foi, significativamente, mais elevada do que no controle, variando de 17% a 67%. A infectividade e reprodução de J2 expostos aos COVs foram significativamente reduzidas se comparadas ao controle, a partir da adição de 3,0% de torta. O efeito conjunto de COVs e moléculas não voláteis oriundas da mistura solo ou substrato mais torta de algodão reduziu significativamente a infectividade e a reprodução a partir de ovos de *Meloidogyne incognita* quando adicionados ao solo (esterilizado ou não) e no substrato artificial em qualquer concentração de torta e tempo de exposição (10 ou 20 dias). A torta de algodão além de apresentar efeitos nematicidas no solo infestado com *M. incognita*, os COVs por ela emitidos possuem ação nematicida e nematostática (ESTUPIÑAN-LÓPEZ et al., 2017).

As plantas sob ataque de herbívoros podem responder produzindo cerca de 200 compostos diferentes e estes compostos promovem a comunicação e interação da planta com o ambiente em sua volta (DUDAREVA et al., 2006). Mesmo existindo vários COVs oriundos de diversas espécies de plantas, ainda há poucos trabalhos correlacionando-os com efeito

tóxico a fitonematoides. Deste modo, os voláteis induzidos após o ataque dos herbívoros desperta o interesse dos pesquisadores, uma vez que eles não só guiam os inimigos naturais em direção à planta hospedeira da presa, mas também na mediação de várias interações ecológicas que têm potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de pragas (PICKETT et al., 2006).

Em relação aos resíduos de processamento de plantas pela indústria, existem poucos estudos de compostos voláteis com potencial nematicida. Porém, há relatos que descartes de vegetais como brócolis, couve-flor e mostarda, pela biofumigação, produzem COVs tóxicos a patógenos de solo como fungos e nematoides. Assim, o volátil presente nas brássicas inibiram a formação de esclerócios em 45 e 47% de dois isolados, Sc18d e Sd21n, respectivamente. Em relação aos nematoides, a maior redução do número de ovos de *M. javanica* por sistema radicular ocorreu quando brócolis foi incorporado e, posteriormente, realizou-se a cobertura do solo com plástico, reduzindo 93% o número de ovos. No entanto, todos os tratamentos em que houve adição de resíduos de brássicas ao solo, independente da cobertura com plástico ou não, apresentou números de ovos inferiores ao da testemunha positiva, implicando que a incorporação isolada do material vegetal ao solo foi suficiente para controlar o número de ovos de *M. javanica*. Os glucosinolatos presentes nos restos culturais de brócolis podem ser hidrolizados em isotiocianatos ou em nitrilas e ambos apresentam toxicidade a fitonematoides (NEVES et al., 2007; LORD et al., 2011; OJAGHIAN et al., 2012).

Outro subproduto que também gera a emissão de COVs, é a farinha de oleaginosas, muito usada na suplementação alimentar de animais. Em 2007 a Índia foi considerada uma das principais produtoras de oleaginosas, produzindo mais de 25 milhões de toneladas por ano, com exportações girando em torno de 4,3 milhões de toneladas de bolo de óleo (RAMACHANDRAN et al., 2007). No entanto, os efeitos tóxicos de muitas oleaginosas e de sua incorporação atuando no controle de fitonematoides ainda são desconhecidos (ESTUPIÑAN-LÓPEZ et al., 2017).

#### **2.4. Semente de mamão no controle de fitonematoides**

Na medicina popular, as sementes de mamão tem sido utilizadas como vermífugo por várias décadas (KRISHNAKUMARI & MAJUMDER, 1960). As sementes de mamão também podem controlar fitonematoides. Por exemplo, a incorporação no solo de farinha de semente de mamão, reduz o número de galhas de *M. javanica* em até 100%, aumentando a

massa da parte aérea e a altura de plantas em relação à testemunha, com efeito aditivo da solarização da área (NEVES et al., 2011). Em outro estudo a farinha de semente de mamão incorporada no solo nas doses de 1, 2 ou 4 g / kg de solo reduziu, respectivamente, o número de ovos em 45, 79 e 95 % (NEVES et al., 2008).

O composto alil isotiocianato, detectado a partir de cromatografia em brássicas, produzido por degradação de glucosinolatos é volátil e tóxico a nematoides e fungos (MAYTON et al., 1996; KERMANSHAI et al., 2001), esta informação sugere a busca deste composto em sementes de mamão. O alil isotiocianato é capaz de reduzir a eclosão, tem efeito nematicida e nematostático, controlando, então, a população de *M. javanica* em até 100% em plantas de tomateiro (NEVES et al., 2008). No entanto, nas emissões voláteis, outros compostos podem estar presentes, bem como substâncias de maior cadeia de carbonos como alcaloides, ácidos graxo, glicosídeos cianogênicos, terpenoides, isotiocianatos, compostos fenólicos, dentre outros (CHITWOOD, 2002).

Apesar da semente de mamão apresentar efeito nematicida quando incorporadas no solo (NEVES et al., 2008; NEVES et al., 2011), a contribuição dos COVs para este processo ainda não foi comprovada em pesquisa, o que pode ser comprovado pelo uso de técnicas modernas como tubo supelco e placa bipartida (BARROS et al., 2014; FERNANDO et al., 2005) que separam os efeitos de moléculas voláteis daquelas não voláteis.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita***

De uma população pura de *Meloidogyne incognita* mantida em tomateiros, cultivar Santa Clara, em casa de vegetação do Laboratório de Nematologia – UFLA. As raízes de tomateiros com galhas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de solo. Em seguida, as raízes foram picadas em pedaços de 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaClO 0,5%, por aproximadamente 20 segundos. Em seguida, o material foi vertido em uma peneira de 200 “mesh” acoplada a outra de 500 “mesh”, recolhenso-se ovos em solução aquosa (BONETI & FERRAZ, 1981).

A contagem dos ovos foi realizada em câmara de Peters e os ovos obtidos foram incubados em câmara de eclosão a 28°C. Os J2 eclodidos a partir de 48 horas da montagem da câmara foram utilizados no experimento, excluindo aqueles eclodidos nas primeiras 24 horas.

#### **3.2. Compostos voláteis de macerados de sementes de mamão**

As sementes foram obtidas de frutos de mamão *Carica papaya*, no comércio local de Lavras - MG. Para avaliar a toxicidade de COVs das sementes de mamão maceradas foi empregada a técnica do tubo SUPELCO (BARROS et al. 2014b). Para isso, foi pesado 1,5 g de sementes de mamão, esterilizada usando hipoclorito de sódio a 2,0 % por 1 minuto, seguido de duas lavagens em água destilada. Após a remoção do excesso de água com papel toalha, o material foi separado, esterilizado, colocado em cadinho de porcelana e macerado, manualmente, sem adição de água (macerado seco). Em tubo SUPELCO esterilizado em autoclave a 120° C por 20 minutos, foram colocados 35 g de areia seca autoclavada (120° C por 20 min) e na superfície da areia foram adicionados 2 ml de água destilada seguido de 1,5 g do macerado anteriormente obtido em cada frasco, constituindo uma parcela (Figura 1). Os tratamentos constituíram-se de diferentes períodos de exposição do J2 aos gases acondicionados na câmara de gás formada dentro do tubo SUPELCO, isto é 1,5h; 3h; 6h; 12h; 24h e 48h de exposição (seis períodos). Frascos preparados como descrito acima, sem sementes de mamão são utilizados como controle. Cada tratamento empregou cinco parcelas como repetições. Em todos os frascos foi aterrado até a metade, um microtubo de 1,5 ml, sem tampa, esterilizado em autoclave a 120° C por 20 min. Entre o microtubo e a parede do tubo SUPELCO foi distribuído o macerado. Em seguida, o tubo SUPELCO foi fechado e envolvida a tampa com papel filme PVC e deixado a 25 °C ( $\pm$  2° C) por três dias em

incubadora para a formação da câmara de gás. A seguir, 1 ml de suspensão contendo cerca de 600 J2 de *M. incognita* foi injetada dentro do microtubo, por meio de uma seringa contendo agulha perfurante, através da película de silicone interposta entre a tampa e o frasco. O orifício criado foi vedado novamente com fita adesiva e os frascos foram mantidos nas mesmas condições anteriores até o momento da avaliação. Após cada período de incubação dos J2 na câmara de gás formada pelo macerado de sementes de mamão (total seis períodos de tempo), o tubo SUPELCO foi aberto e de cada microtubo foram retirados 40 µL da suspensão de J2 ( $\pm 20$  J2) e transferidos para poços de placas de polipropileno (ELISA), juntamente com 50 µL de água. Foi quantificada a percentagem de J2 móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida. Em seguida, cada cavidade das placas de ELISA foi preenchida com água destilada e as placas foram novamente submetidas às mesmas condições de 25° C ( $\pm 2^\circ$  C). Os nematoides mantidos sem movimento após 24 horas foram considerados mortos (mortalidade). O restante da suspensão contendo aproximadamente 550 J2 em cada período de incubação foi inoculado em tomateiro para avaliação in vivo.

**Figura 1** – Tubos supelcos contendo areia + macerado de sementes de mamão + microtubo aterrado.



### 3.3. Infectividade e reprodução de J2 de *M. incognita*

Após cada um dos seis períodos de exposição dos J2 às emissões voláteis de sementes de mamão, relatados no ensaio anterior, a população de aproximadamente 550 J2 foi inoculada em tomateiro cultivar Santa Clara. Para isto a suspensão (550 J2) contida no

microtubo foi transferida para 4 ml de água destilada e esterilizada e, então, inoculada em tomateiro com 20 dias após a semeadura, em vasos de 1000cm<sup>3</sup> preenchidos com substrato artificial. O inóculo foi distribuído ao redor do caule da muda a uma profundidade de 1,5 cm distribuído em 4 orifícios que foram preenchidos com substrato. As mudas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação e adubação recomendada para a cultura. Após 40 dias, cada muda foi retirada do vaso e colocada em balde com água. O substrato foi retirado, cuidadosamente, das raízes. O sistema radicular foi colocado em papel toalha para eliminar o excesso de água, pesado e contado o número de galhas. As raízes foram, então, cortadas em fragmentos de 0,5 cm e processadas pela técnica de Hussey & Barker (1973). Os ovos recolhidos foram contados em microscópio de objetiva invertida.

#### **3.4. Biofumigação com macerado de sementes de mamão**

Para este experimento, copos plásticos foram preenchidos com 100g de substrato organo-mineral. Em seguida, macerados de sementes de mamão, obtidos conforme já descrito, foram incorporados ao substrato nas quantidades de 0; 1; 2; 4; 8 g correspondendo a uma porcentagem de 0; 0,99; 1,96; 3,84; 7,4 %. Como controle negativo os copos com substrato não receberam macerados de sementes de mamão e, como controle positivo, foi utilizado o nematicida Basamid, com isotiocianato de princípio ativo . Uma suspensão contendo 3.000 ovos de *M. incognita* em 2,5 ml de água foi colocada em saco plástico juntamente com o substrato mais o macerado de sementes e misturados sob agitação até a homogeneização. Desta forma, os ovos foram submetidos aos efeitos de moléculas voláteis e não voláteis. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e colocada em copos, ajustando-se a umidade para 60% da capacidade de campo (CC). Como controle negativo, foi utilizado substrato sem adição do macerado de sementes com a umidade também ajustada para 60% da CC. Como controle positivo, adicionou-se o nematicida Basamid e os ovos no substrato com umidade de 60% da CC. Como o Basamid é fitotóxico o procedimento para seu uso neste ensaio constou do seguinte: a mistura Basamid, mais substrato, mais ovos foi fechada por 3 dias em uma garrafa pet e agitada, diariamente. Ao final, abriu-se a garrafa e deixou-a em um recipiente aberto por mais 5 dias, revolvendo-o diariamente. Após então, oito dias, colocou-se a mistura em copos e plantou-se uma plântula de tomateiro por copo.

Para estudar isoladamente o efeito dos COVs sem interferência das moléculas não voláteis, foi colocado um microtubo de 1,5 ml de capacidade aterrado até sua metade na superfície da mistura (substrato + macerado vegetal + ovos) dentro do copo (Figura 2). A

superfície da mistura no copo foi recoberta completamente com filme plástico, formando assim uma câmara de gases entre o plástico e o substrato pelas emissões do macerado seco das sementes misturadas ao substrato. Uma fita adesiva de 2 x 2 cm foi colocada na superfície interna do filme plástico vedante oposta ao microtubo, a fim de permitir maior resistência à perfuração posterior pela seringa evitando o aumento do diâmetro do orifício feito. Após três dias de vedação, com uma seringa contendo agulha perfurante, foi injetado 1ml de suspensão contendo 600 ovos de *M. incognita* no interior do microtubo. O furo resultante foi vedado com fita adesiva. Os ovos foram deixados expostos aos COVs liberados da mistura por três dias. A seguir, o filme plástico foi retirado e 40 µL da suspensão de ovos do microtubo de cada repetição foram transferidas para placa ELISA, juntamente com 50 µL de água para completar o volume. Foi avaliada, em microscópio de objetiva invertida, a quantidade de ovos presente em cada alíquota retirada. Posteriormente, foi avaliada a eclosão durante 6, 9, 12 e 15 dias (quatro tempos), completando diariamente o volume dos poços da placa de ELISA com água destilada. As placas após as avaliações, foram incubadas a 25 °C ( $\pm 2$  °C). Após a retirada do filme plástico vedante, uma plântula de tomateiro contendo quatro pares de folhas foi transplantada para cada copo contendo os ovos de *M. incognita* em mistura com substrato e no macerado de sementes de mamão. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 40 dias quando foram avaliados peso de raiz, número de galhas e de ovos por sistema radicular.

**Figura 2** – Copos utilizados na biofumigação contendo macerado de sementes de mamão + ovos de *M. incognita* + substrato. No meio há um microtubo aterrado.



### **3.5. Toxicidade da água exposta aos voláteis emitidos pelas sementes de mamão maceradas**

Para este ensaio, 35g de areia autoclavada foram adicionadas em frascos SUPELCO. Na superfície da areia foi depositada água destilada (2 mL) seguida do macerado de sementes de mamão (1,5 g). Dentro de cada frasco também foi colocado um microtubo (2 mL) contendo água destilada (1 mL) no seu interior. Como controle positivo foi utilizado o macerado seco da inflorescência de brócolis (1,5 g), que apresenta toxicidade a *M. incognita* (SILVA, 2018). Como controle negativo, foram utilizados frascos sem macerado mas contendo areia e microtubo com água. Em seguida, os frascos foram fechados e mantidos a 25 °C durante 72 h. Ao final, os microtubos foram retirados do interior dos frascos. E dentro de cada microtubo foi adicionada uma suspensão (0,5 mL) contendo 600 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Os microtubos foram então fechados com tampa rosqueada e mantidos a 25 °C por 1,5; 3; 6; 12; 24 e 48 h. A seguir, os respectivos períodos de incubação, os microtubos foram abertos e 40 µL da suspensão foram recolhidas dos microtubos e transferidos para poços de placas de polipropileno de 96 células (ELISA), sendo quantificada a percentagem de J<sub>2</sub> móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida (Nikon TMS-F N°. 211213). A mortalidade dos J<sub>2</sub> foi avaliada 24 h após cada tempo de exposição e de contagem da imobilidade.

### **3.6. Infectividade e reprodução dos J2 expostos a água da câmara de gás contendo macerado de sementes de mamão**

Neste ensaio foi utilizado o restante da suspensão de J<sub>2</sub> do microtubo em que se avaliou a mortalidade no ensaio anterior. Após a retirada da alíquota de 40 µL para avaliação da mortalidade foram utilizados os 550 J<sub>2</sub> para inocular em tomateiros. Assim, foram estudados os mesmos tempos de exposição dos J<sub>2</sub> do ensaio anterior. A suspensão contida no microtubo ( $\pm 550$  J<sub>2</sub>) foi transferida para 4 ml de água destilada e esterilizada e, então, inoculada em cada plântula de tomate com 20 dias após a semeadura, em bandejas de isopor de 76 células (120 cm<sup>3</sup> cada) preenchidas com substrato organo-mineral. O inóculo foi colocado em volta do caule da planta a uma profundidade de 1,5 cm distribuído em 4 orifícios que foram preenchidos com o mesmo. As mudas foram mantidas em casa de vegetação com rega diária por 40 dias. A muda foi retirada da bandeja e colocada em balde com água e o substrato foi removido cuidadosamente da rizosfera. As raízes foram limpas e colocadas em papel toalha para eliminar o excesso de água. O sistema radicular será pesado, contado o número de galhas e as raízes foram cortadas em fragmentos de 0,5 cm e processadas pela

técnica de Boneti & Ferraz (1981). Os ovos recolhidos foram contados em microscópio de objetiva invertida.

### **3.7. Análise de COVs emitidos pelas sementes de mamão por cromatografia gasosa**

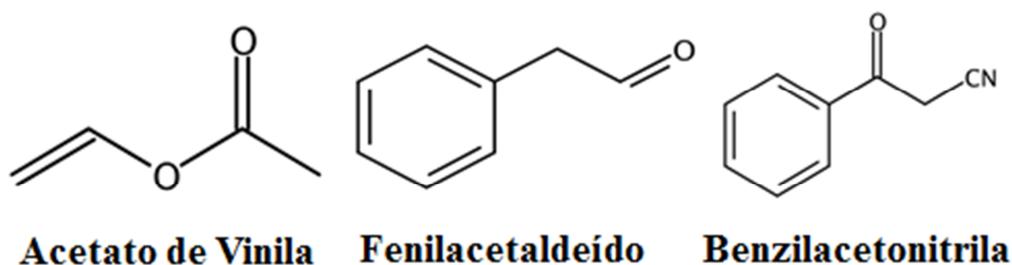
Foram preparadas seis replicatas de 1,5g de macerados de sementes de mamão para análise de COVs e seis replicatas de água anteriormente exposta aos voláteis do macerado de sementes de mamão. Como controle foram preparados 6 amostras utilizando areia autoclavada e tubos vazios para comprovar que os compostos encontrados foram realmente das sementes de mamão. As amostras foram colocadas em frascos supelco de SPME de 20 ml, fechadas, com tampa envolvida com filme plástico PVC, mantidas em incubadora a 28 °C. Três dias após, foram analisados os voláteis das emissões dos macerados e da água que foi anteriormente exposta a eles. Para a extração dos COVs foi empregada a técnica de SPME no modo headspace, usando a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano). A temperatura e o tempo de extração foram 55 °C a 250 rpm durante 35 minutos, respectivamente. Para a separação e identificação dos COVs foi usado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250 °C, da interface de 240 °C e da fonte de íons do detector de 200 °C. O injetor foi operado no modo *splitless* ou no modo *split* 1:2, de acordo com a intensidade dos picos nas amostras. Como gás de arraste foi usado He grau 5.0 a 1,0 ml.min<sup>-1</sup>. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40 °C até 130 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> e então até 240 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>. Para identificação dos COVs nas amostras, os espectros de massas de cada pico do cromatograma foram extraídos através do programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63. A identificação dos COVs foi realizada por comparação dos espectros de massas dos picos das amostras com espectros da biblioteca NIST pelo programa Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington - DC, USA) e por comparação dos índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (ADAMS, 2007; NIST, 2013; ROHLOFF E BONES, 2005). Os índices de retenção experimentais foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos. Para a comparação entre os espectros de massas foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%.

### 3.8. Toxicidade de moléculas encontradas nas emissões gasosas pelo GC-MS

Foram adquiridas no mercado e testadas quanto a toxicidades a *M. incognita* como as moléculas acetato de vinila, benzaldeído, fenilacetaldéido, óxido de linalool, linalool, benzilacetoneitrila e isopulegol, todas encontradas nas emissões voláteis de sementes de mamão e fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich, Saint Louis – MO, USA. A toxicidade foi avaliada em um microtubo de 0,6 ml contendo uma suspensão aquosa (200 µL) com 100 µL contendo aproximadamente 25 J2 em água e 100 µL da solução de moléculas nas concentrações de 2000 µg / mL e 1000 µg / mL diluídas em solução aquosa de Tween 80® a 0,01 g / mL, para que no final ficasse na concentração desejada de 1000 µg / mL e 500 µg / mL. Como controle foram utilizados Tween 80® a 0,01 g / L e água destilada. Os microtubos foram fechados e mantidos a 25 °C por 48h. Após o período, foram homogeneizados os microtubos e retirou-se toda a solução (200 µL) transferindo-a para poços de 300 µL em placas de polipropileno de 96 células (ELISA). Foi avaliado o número de J2 móveis. Para determinar se os J2 que estavam imóveis ainda estavam vivos, uma gota (10 µL) de NaOH 1M, recentemente preparado, foi adicionada em cada poço da placa. Os J<sub>2</sub> que reagiram ao NaOH, movimentando o seu corpo num intervalo de 3 minutos foram considerados vivos, caso contrário, foram considerados mortos (CHEN & DICKSON, 2000 adaptado por AMARAL et al., 2003). Somente as moléculas que causaram mortalidade acima de 80% foram selecionadas para a determinação das concentrações letais (CL50 e CL95), sendo elas acetato de vinila, benzaldeído, fenilacetaldéido e benzilacetoneitrila (Figura 3). Para determinar a CL50 e CL95 da mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita*, foram selecionadas as moléculas acetato de vinila, fenilacetaldéido e benzilacetoneitrila, as quais foram avaliadas em 7 concentrações diferentes (25, 50, 75, 100, 150, 200 e 400 µg / mL). Deste modo, preparou-se uma solução estoque a 800 µg / mL, a qual serviria para gerar novas soluções com 400, 300, 200, 150, 100 e 50 µg / mL. As soluções foram preparadas sempre com o dobro da concentração desejada para adicionar posteriormente a mesma quantidade em relação a suspensão contendo nematoides, atingindo, assim, a concentração final desejada. A molécula benzaldeído foi excluída dos testes por já existir relatos da toxicidade dela in vitro e in vivo (NUNES et al., 2013; BARROS et al., 2014; ULLAH et al., 2015; JARDIM et al., 2017). Foram utilizados Tween 80® a 0,01 g / L e água como controles negativos e o carbofuram® (2,3-dihidro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methylcarbamate, 98%, Sigma-Aldrich) como controle positivo avaliado em 5 concentrações diferentes (90, 130, 170, 210 e 250 µg / mL), utilizando o mesmo método de preparo das substâncias, descrito anteriormente. O período de exposição

de J2 aos voláteis das moléculas e as diversas concentrações foi de 48 h, sendo avaliada a mobilidade e, posteriormente, a mortalidade com o auxílio do NaOH como descrito (CHEN & DICKSON, 2000; AMARAL et al., 2003).

**Figura 3** – Estrutura molecular de Acetato de vinila, fenilacetaldeído e benzilacetoneitrila.



### 3.9. Análise estatística dos dados

Todos os experimentos foram repetidos duas vezes. Os ensaios foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Os dados foram, previamente, submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). Uma vez atendidos os pressupostos, foi aplicado o teste F, por meio da análise de variância (ANOVA). Quando ocorreu significância ( $P < 0.05$ ), as médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Tukey, utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2000).

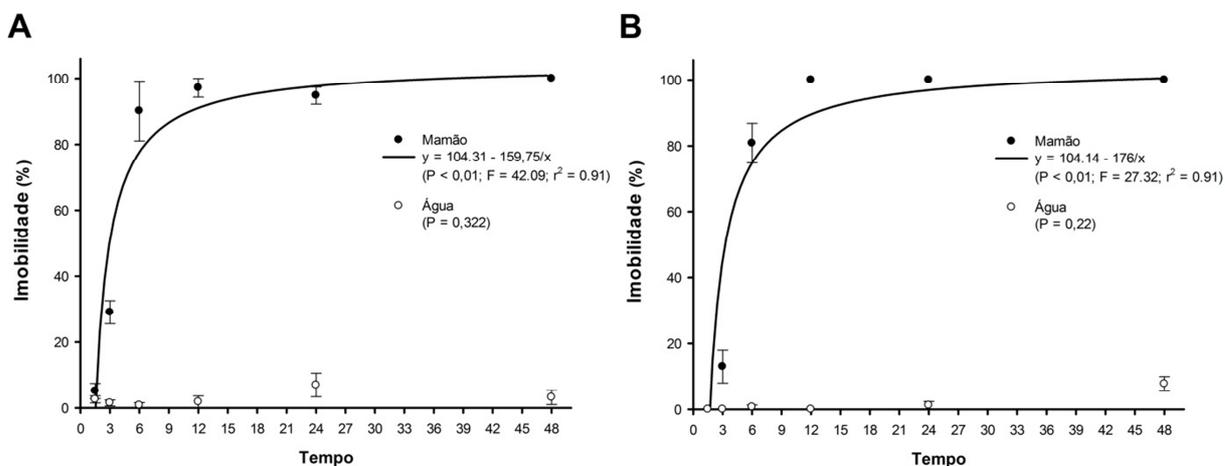
No ensaio sobre as concentrações letais utilizou-se a análise probit para encontrar as CL50 e CL95 das moléculas testadas in vitro. Como os resultados dos dois experimentos e das repetições foram semelhantes, os experimentos foram agrupados em um só e foram analisados juntos no probit perfazendo-se 10 repetições para cada tratamento na busca das médias das CL50 e CL95.

## 4. RESULTADOS

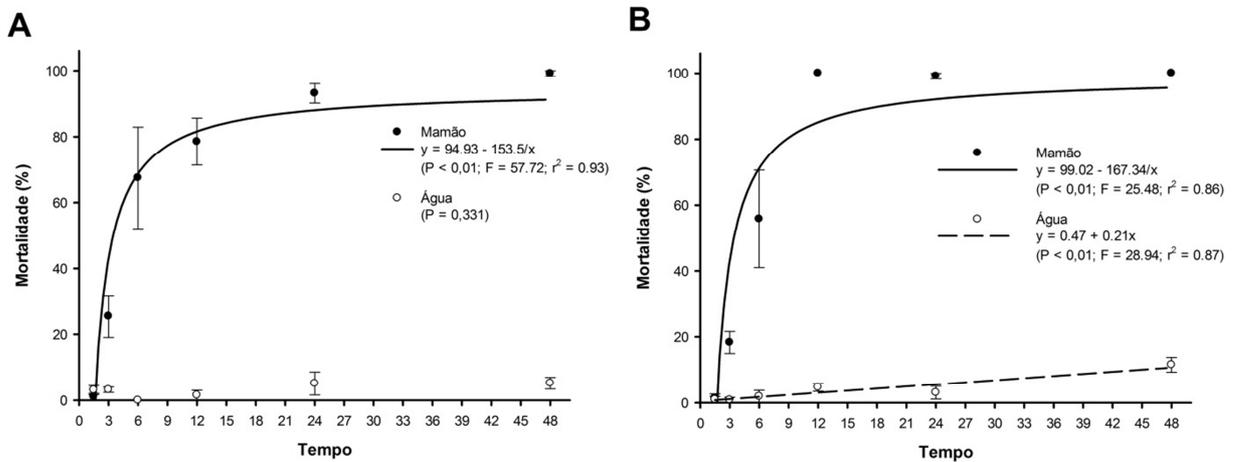
### 4.1. Tempo de exposição dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* aos voláteis

Ocorreram diferenças significativas entre os tempos de exposição dos J2 aos voláteis das sementes de mamão, tanto em relação a imobilidade quanto em relação a mortalidade dos J2 de *M. incognita* ( $p < 0.05$ ). Também os resultados dos experimentos A e B foram semelhantes (Figuras 4 - A e B e 5 - A e B). Em relação a imobilidade, no experimento A, o macerado das sementes de mamão imobilizou acima de 80% após o tempo de exposição de 6 horas, atingindo a imobilidade máxima de 100% no tempo máximo de 48 horas (Figura 4 - A). No experimento B, percebe-se que a imobilidade também foi de aproximadamente 80% no tempo de 6 horas (Figura 4 - B). Já na mortalidade, observa-se no experimento A que a partir do tempo de 12 horas a mortalidade dos J2 de *M. incognita* foi de, aproximadamente, 80% e chegou na mortalidade máxima no tempo máximo de 48 horas (Figura 5 - A). O mesmo ocorreu no experimento B, onde a partir do tempo de 12 h a mortalidade já foi bem alta se aproximando de 100%, o que se manteve constante até o tempo máximo, matando 100% dos nematoides (Figura 5 - B). Em ambos os experimentos (A e B), comparados com o controle negativo ocorreu maior imobilização e morte de J2 em qualquer tempo de exposição (Figuras 4 - A e B e 5 - A e B).

**Figura 4** – Porcentagem da imobilidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em função do tempo de exposição aos voláteis das emissões de sementes de mamão. Comparação dos dois ensaios A e B.



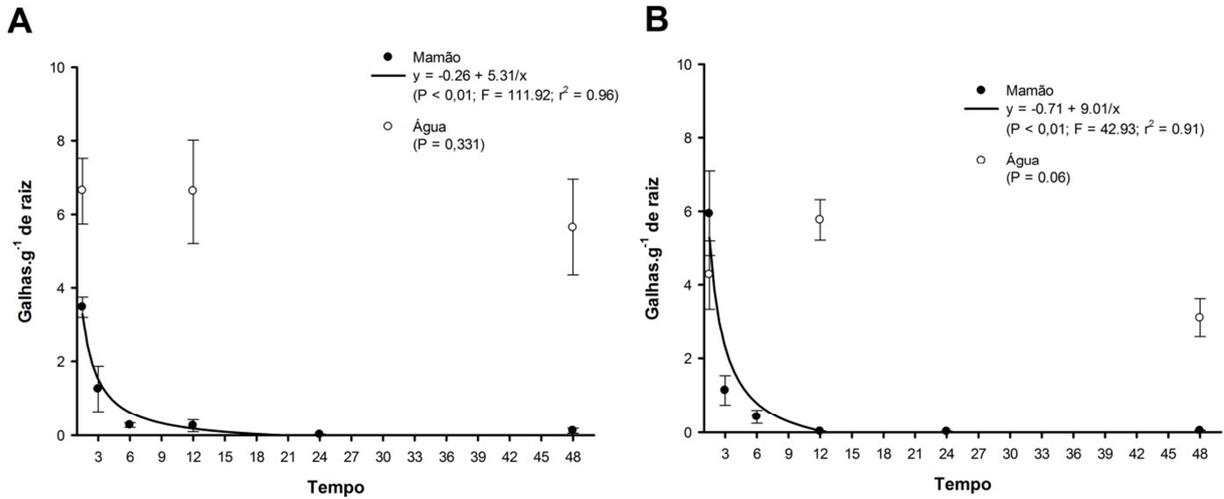
**Figura 5** – Porcentagem da mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em função do tempo de exposição aos voláteis das emissões de sementes de mamão. Comparação dos dois ensaios A e B.



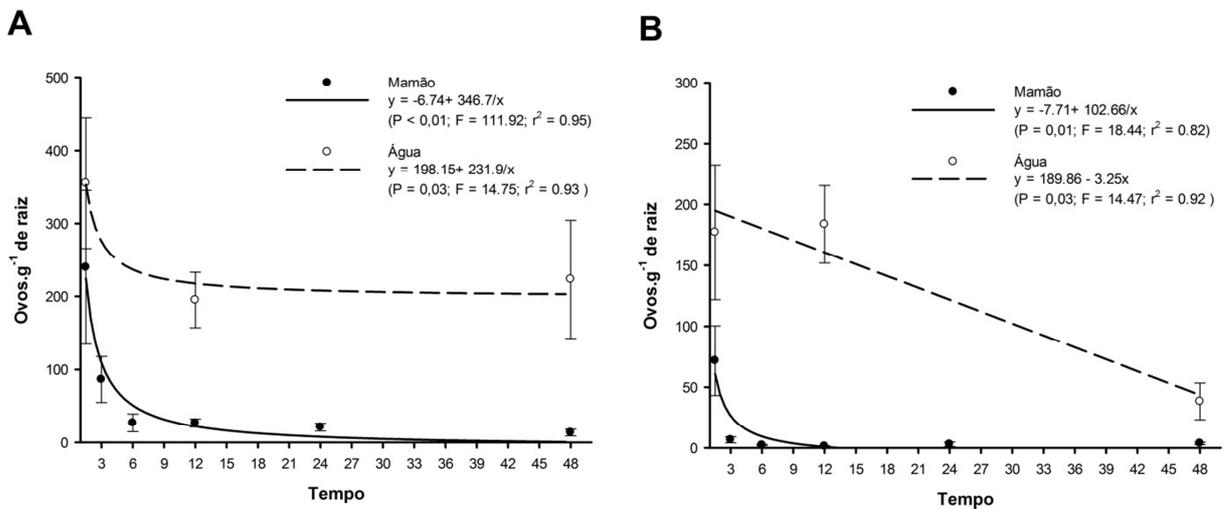
#### 4.2. Infectividade e reprodução de J2 de *M. incognita*

Houve diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre os tempos de exposição de J2 de *M. incognita* aos voláteis de sementes de mamão tanto em relação a quantidade de galhas como ovos por grama de raiz nos dois experimentos A e B (Figuras 6 – A e B e 7 - A e B). No experimento A, a quantidade galhas começou a decair drasticamente a partir do tempo de 6 horas, quando quase não se observava galhas. A diminuição seguiu até atingir o tempo máximo de 48 horas quando o número de galhas se aproximou de zero (Figura 6 - A). De forma semelhante, no experimento B, confirmou a redução de galhas, no tempo de 6 h chegando a aproximar-se de zero à 48 horas de exposição dos J2 (Figura 6 - B). Com relação a produção de ovos, ocorreu no experimento A, diminuição expressiva a partir do tempo de 6 horas, chegando a menos de 50 ovos/g raiz, quando comparado com a testemunha, valores em torno de 200 ovos/g de raiz, cujo valor de ovos dos tratamentos aproximou-se de zero às 48 horas de exposição dos J2 (Figura 7 - A). No experimento B, observou-se padrão semelhante com redução ainda maior a partir de 6 horas e também chegando a zero às 48 horas de exposição dos J2 (Figura 7 – B). Nos dois experimentos ocorreram diferenças significativas entre galhas e ovos em qualquer tempo de exposição dos J2 comparados ao controle de água, porém sempre com tendências na redução semelhantes.

**Figura 6** – Número de Galhas por grama de raiz em função do tempo de exposição dos J2 de *M. incognita* aos voláteis emitidos pelos macerados.



**Figura 7** – Número de Ovos por grama de raiz em função do tempo de exposição dos J2 de *M. incognita* aos voláteis emitidos pelos macerados.



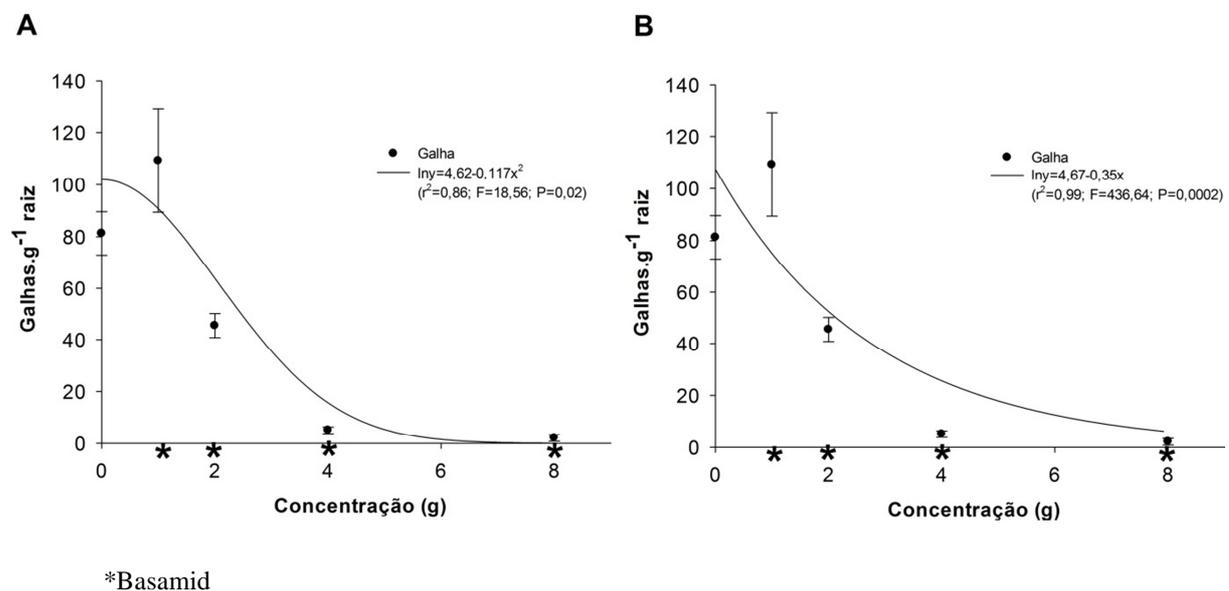
### 4.3. Biofumigação com macerado de sementes de mamão

Os voláteis emitidos e as emissões não voláteis durante o processo de biofumigação causaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre as diversas quantidades dos macerados de sementes de mamão e o número de galhas e ovos por grama de raiz. Tanto no experimento A, quanto no B, fica evidente que com o aumento da concentração do macerado de sementes de mamão ocorreu diminuição no número de galhas e ovos por grama de raiz. Em relação as galhas, nos experimentos A e B, a partir da concentração de 4 g de macerado ocorreram reduções significativas no número de galhas, chegando a menos de 10 galhas / g raiz. A

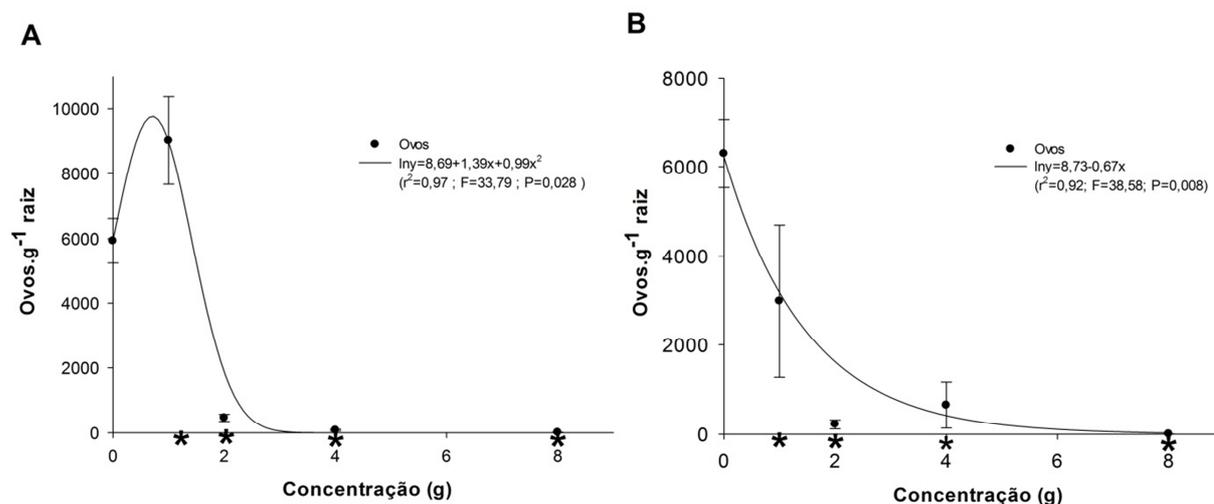
diminuição no número de galhas continua com o aumento das concentrações até alcançar 100% de controle na maior concentração (8g) (Figura 8 – A e B). Já em relação aos ovos, nos experimentos A e B, observou-se redução inferior a 500 ovos / g raiz a partir da concentração de 2 g de macerado chegando a 100% de redução no número de ovos comparado com o controle (Concentração de zero gramas) na concentração de 4 g e 8g e macerados (Figura 9 – A e B). Em cada experimento (A e B) os dados foram comparados com o Basamid (controle positivo) e representado nas Figuras 8 - A e B e 9 - A e B com o asterisco. No entanto os valores foram sempre zero para galhas e ovos.

Quando os ovos foram apenas expostos aos voláteis por três dias não houve diferença significativa entre as emissões de quantidades de macerados de sementes de mamão na biofumigação nos dois experimentos (A e B). Deste modo, os voláteis emitidos não foram capazes de inibir a eclosão de J2 de *M. incognita*.

**Figura 8** – Número de Galhas por grama de raiz em diferentes concentrações de macerados de sementes de mamão. \* Controle positivo, Basamid.



**Figura 9** – Número de Ovos por grama de raiz em diferentes concentrações de macerados de sementes de mamão. \* Controle positivo, Basamid.



\*Basamid

#### 4.4. Toxicidade da água exposta aos voláteis emitidos pelas sementes de mamão maceradas in vitro e in vivo

Na água exposta por diversos tempos, desde 1,5 h até 48 h aos voláteis de macerados de sementes de mamão não causou imobilidade e nem mortalidade significativa dos J2 de *M. incognita* em testes in vitro. Também não ocorreu significativa queda de infectividade e reprodução quando os J2 expostos aos voláteis de macerados de sementes de mamão foram inoculados em tomateiros em testes in vivo.

#### 4.5. Análise de COVs emitidos pelas sementes de mamão por cromatografia gasosa

As análises por GC-MS dos voláteis emitidos pelos macerados de sementes de mamão e da água a eles exposta revelaram 17 compostos no total (Tabela 1). Os compostos identificados foram categorizados como baixa (“v”), mediana (“vv”) e alta (“vvvv”), pela intensidade dos picos detectados nos cromatogramas. Os compostos identificados e com intensidades medianas e altas foram: 3-metil-butanal, 2-metil-butanal, benzaldeído, fenilacetaldeído, benzilisocianato, benzilacetoneitrila e isotiocianato de benzila. Com exceção do composto benzilisocianato, todos os outros compostos estiveram em quantidades medianas e altas tanto na água exposta, quanto no macerado. Dos compostos que ocorreram no macerado se sementes de mamão, estiveram ausentes na água exposta aos compostos o carbono óxido sulfeto, linalool e nonanal. Completa a lista, os compostos dissulfeto de

carbono, 2-metil-propanal, acetato de vinila, hexenal, óxido de linalool, tetrametilpirazina, isopulegol, que ocorreram em pequenas intensidades tanto na água quanto no macerado se semente de mamão (Tabela 1).

**Tabela 1** - Compostos orgânicos voláteis identificados no macerado de semente de mamão e na água exposta ao macerado através da cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas.

Compostos	IR	IR	Similar (%) <sup>c</sup>	Semente	Água
	experimental <sup>a</sup>	literatura <sup>b</sup>			
1- Sulfeto de carbonila	-	-	90	x	-
2- Dissulfeto de carbono	-	-	90	x	x
3- 2 metil-propanal	-	546	87	x	x
4- Acetato de vinila	603	-	90	x	x
5- 3-metil-butanal	653	654	90	xx	xx
6- 2-metil-butanal	664	664	90	xx	xx
7- Hexenal	804	801	90	x	x
8- Benzaldeído	962	961	96	xx	xx
9- Fenilacetaldéido	1033	1039	97	xx	xx
10- Óxido de linalol	1066	1067	80	x	x
11- Tetrametilpirazina	1081	1086	81	x	x
12- Linalol	1094	1095	82	x	-
13- Nonanal	1098	1100	88	x	-
14- Benzilisocianato	1120	1125	92	xx	x
15- Benzilacetoneitrila	1136	1140	96	xx	x
16- Isopulegol	1146	1145	90	x	x
17- Isotiocianato de benzila	1373	1377	97	xxxx	xx

x: Composto minoritário; xx: composto mediano; xxxx: composto maioritário presente nas amostras.

<sup>a</sup> Índices de retenção calculados por injeção de uma série homóloga de alcanos

<sup>b</sup> Índices de retenção de acordo com a literatura (Adams, 2007; NIST, 2013)

<sup>c</sup> Semelhança entre o pico do espectro de massa e o espectro de massa da biblioteca

- Dados não disponíveis

#### 4.6. Toxicidade de moléculas encontradas nas emissões gasosas pelo GC-MS

Das sete moléculas testadas, constatou-se ação nematocida em acetato de vinila, benzaldeído, fenilacetaldéido e benzilacetoneitrila, matando, na concentração de 500 µg / mL, 92, 91, 94 e 96% dos J2 e na concentração de 1000 µg / mL, 97, 93, 96 e 97%. Pela análise proibit, foram determinadas as CL 50 e CL 95 das moléculas acetato de vinila, fenilacetaldéido e benzilacetoneitrila, além do nematocida carbofuram®. Os dados foram analisados separadamente em ambos os experimentos A e B, e, devido sua semelhança, foram analisados

no probit como um único experimento constando de 10 repetições no total gerando valores médios de CL 50 e CL95 (Tabela 2).

**Tabela 2** – CL50 e CL95 em µg / mL dos experimentos A e B e da média dos experimentos in vitro com as substâncias acetato de vinila, fenilacetaldeído e benzilacetonitrila encontradas nas emissões de sementes de mamão, além do carbofuram®

	<b>Experimento A</b>		<b>Experimento B</b>		<b>Média dos Experimentos</b>	
	<b>CL50</b>	<b>CL95</b>	<b>CL50</b>	<b>CL95</b>	<b>CLm50</b>	<b>CLm95</b>
<b>Acetato de vinila</b>	58	151	64	172	61	162
<b>Fenilacetaldeído</b>	125	362	81	305	103	334
<b>Benzilacetonitrila</b>	14	48	15	40	15	44
<b>Carbofuram®</b>	175	338	154	312	165	325

## 5. DISCUSSÃO

A capacidade nematicida da farinha de mamão já foi demonstrada incorporando-a em solo e substrato infestados por fitonematoides (NEVES et al., 2008; COUTINHO et al., 2009; NEVES et al., 2011). A causa desta atividade nematicida pode tornar insumo para a indústria de pesticidas, quando novas moléculas ativas são encontradas. Neste trabalho, ocorreu mobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita* quando se usou macerado de sementes de mamão mesmo em curtos períodos de tempo de exposição, comprovando sua eficácia no controle. Isto se deve a moléculas voláteis tóxicas a *M. incognita* reveladas pela análise por cromatografia gasosa. A alta imobilidade e consequentemente mortalidade implicou na redução da infectividade e reprodução em tomateiros pela redução na formação de galhas, bem como no número de ovos. A mortalidade dos nematoides pode estar associada a atuação dos COVs no sistema nervoso do nematoide impedindo-o de reconhecer e localizar o hospedeiro ou o local de alimentação (BARROS, 2014a, 2014b). Voláteis emitidos por plantas tem causado mortalidade, redução de infectividade e reprodução de *Meloidogyne* spp. em plantas infectadas (BARROS et al., 2014) bem como defendem plantas contra herbívoros e patógenos (PICHERSKI & GANG, 2000; DUDAREVA & PICHERSKY, 2008).

Apesar da demonstração da toxicidade dos voláteis das emissões de sementes de mamão *in vitro* e *in vivo* neste trabalho, água exposta aos voláteis não se tornou tóxica a J2 de *M. incognita*, indicando que as moléculas tóxicas não são temporariamente retidas na água, ou são retidas em quantidades insuficientes para imobilizar ou matar os nematoides. Assim, a ineficiência das moléculas dissolvidas na água pode estar associada a solubilidade delas em água. Cada molécula apresenta características específicas e as ditas polares são solubilizadas mais rápido, sendo retidas em água, devido as interações presentes, como pontes de hidrogênio e ligações dipolo-dipolo (RUIZ et al., 1998).

A biofumigação foi capaz de reduzir o número de galhas e de ovos de *M. incognita*. Em outros trabalhos com incorporação de farinha de sementes de mamão no solo ocorreram redução de galhas e ovos de *Meloidogyne incognia* e *M. javanica* (NEVES et al., 2008; COUTINHO et al., 2009; NEVES et al., 2011), bem como em outros estudos de incorporação de partes vegetais no solo obtiveram o controle de fungos patogênicos e nematoides (WANG et al., 2009) e também estudos incorporando restos vegetais de brócolis obtiveram redução da população de *Meloidogyne incognia* e *M. javanica* (PLOEG & STAPLETON, 2001). No caso

dos estudos com brássicas, observa-se que elas apresentam compostos tóxicos como os glucosinolatos que é hidrolisado pela enzima mirosina se originando o composto isotiocianato. O mesmo ocorre com as sementes de mamão por apresentar como majoritário o composto isotiocianato, demonstrado sempre em cromatografia gasosa (BONES & ROSSITER, 2006; AIRES et al., 2009; OJAGHIAN et al., 2012). Os isotiocianatos apresentam ação nematicida e fungicida (ZASADA & FERRIS, 2003; OJAGHIAN et al., 2012).

Os vapores resultantes da biofumigação, contudo, não afetaram a eclosão de J2 de *M. incognita*. Desta forma, o tempo de exposição dos ovos aos voláteis por apenas 3 dias pode ter sido insuficiente ou os ovos são mais resistentes aos efeitos de moléculas comparados aos J2 de *M. incognita*, uma vez que exposições de J2 aos voláteis mesmo por períodos tão curtos como 6 h, neste trabalho, causaram perdas de infectividade e reprodução (Figura 6 e 7). Nos ovos, a camada lipídica, após a casca do ovo, protege a entrada de moléculas tóxicas ao embrião em formação (GAUGLER & BILGRAMI, 2004). No entanto, a constatação também, neste trabalho, de que a exposição da água na câmara de vapores de macerado de sementes de mamão por 72 h não tornou-a tóxica aos ovos de J2 de *M. incognita* mas a cromatografia gasosa revelou nela ocorrência da maioria dos compostos que ocorreram no ambiente da câmara ao que tudo indica a quantidade dos compostos presentes na água exposta aos vapores foi incapaz de causar toxicidade aos J2. E que as moléculas polares são mais dissolvidas na água comparadas com as apolares (RUIZ et al., 1998). Muitas plantas tem demonstrado presença de voláteis tóxicos a J2, mas a exposição da água a eles não a tornam tóxica (BARROS et al., 2014b; SILVA, et al., 2018). No entanto, existem voláteis emitidos por fungos e plantas que tornam a água tóxica a fitonematoides após a exposição a eles (FREIRE et al., 2012; GRIMME et al., 2017; SILVA et al., 2018).

A composição complexa das emissões de macerado de sementes de mamão sugere muitas investigações sobre as moléculas encontradas. Mas quatro delas demonstraram ação nematicida (Tabela 2), podendo não só surgir novos compostos eficazes no controle de fitonematoides, mas também levar à síntese de novos produtos (TERRA et al., 2018). Dos 17 compostos voláteis encontrados (Tabela 1), o isotiocianato foi o mais intenso, sendo o componente que apresentou o maior pico nas análises cromatográficas e tem sido comprovada a sua eficácia no controle de nematoides (ZASADA & FERRIS, 2003; OJAGHIAN et al., 2012). Outro composto também presente (Tabela 1) foi o benzaldeído, que é nematicida com

CL 50 de 171  $\mu\text{g} / \text{mL}$  contra J2 de *Meloidogyne* (ULLAH et al., 2015; NUNES et al., 2013). Foi a primeira demonstração, neste trabalho, que moléculas voláteis encontradas nas emissões de sementes de mamão, como a benzilacetoneitrila, fenilacetaldeído e acetato de vinila (Figura 3), causaram toxicidade a *M. incognita*. É importante salientar que, o ácido fenilacético é um intermediário da fenilalanina, que apresenta algumas características capazes de sinalizar interações microbinas com seus hospedeiros, sendo relevante estudar sua semelhança química com o fenilacetaldeído e sua aplicação no controle de fitopatógenos, como no caso dos fitonematoides (LIGHTLY et al., 2017).

Neste trabalho, que os valores de CL50 encontrados para o acetato de vinila, fenilacetaldeído e benzilacetoneitrila, 61  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , 103  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e 15  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente, estão aquém de qualquer valor encontrado para o carbofuran® (controle positivo), isto é, 165  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , que é um nematicida comercial disponível e amplamente utilizado no campo (NUNES, 2013). Valores da CL50 do carbofuran® variam de acordo com os testes realizados entre os autores, podendo ser encontrado outros valores como 191  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (TERRA et al., 2018) e 260  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (NUNES et al., 2013). Portanto, os valores da CL50 do acetato de vinila, fenilacetaldeído e benzilacetoneitrila são inferiores aquele da CL50 do carbofuran® (controle positivo) o que indica alto potencial de controle delas contra *M. incognita*, como provavelmente em testes de casa de vegetação na infectividade e reprodução. Outras moléculas encontradas nas emissões de farinha de mamão precisam ser investigadas mais profundamente quanto sua ação nematicida tanto separadamente quanto misturadas.

## 6. CONCLUSÕES

Macerados de sementes de mamão emitem compostos orgânicos voláteis nematostáticos e nematicidas contra *M. incognita*. Os COVs de sementes de mamão reduzem a infectividade e reprodução de J2 e reduzem galhas e ovos quando os J2 a eles expostos foram inoculados em tomateiro. Em biofumigação com sementes de mamão COVs e compostos não voláteis liberados no solo reduzem o número de galhas e ovos de *M. incognita* em tomateiro. As moléculas, acetato de vinila, fenilacetaldeído e benzilacetonitrila são tóxicas a *M. incognita*, CL 50 de 61 µg / mL, 103 µg / mL e 15 µg / mL, respectivamente.

## **7. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao apoio financeiro e as bolsas de estudos fornecidas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth ed. **Allured Publishing Corporation**, USA, 2007.

AIRES, A.; CARVALHO, R.; BARBOSA, M.C.; et al. Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, with extracts of brassicacea plants. **American Journal of Potato Research**, v. 86, p. 327–333, 2009.

AMARAL, D.R.; OLIVEIRA, F.E.R.; OLIVEIRA, D.F.; et al. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, v. 5, p. 859–864, 2003.

ARAUJO, F.F.; BRAGANTE, R.J.; BRAGANTE, C.E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n.2, p. 220-224, 2012.

BALDIN, E.L.L.; WILCKEN, S.R.S.; PANNUTI, L.E.R.; et al. Uso de extratos vegetais, manipueira e nematicida no controle do nematoide das galhas em cenoura. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 36-41, 2012.

BARROS, A.F.; CAMPOS, V.P.; SILVA, J.C.P.; et al. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. **Nematropica** v. 44, p. 190–199, 2014a.

BARROS, A.F.; CAMPOS, V.P.; SILVA, J.C.P.; et al. Nematicide activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34–43, 2014b.

BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia: conceitos e benefícios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**, v. 1, p. 540-553, 1995.

BONES, A.M. & ROSSITER, J.T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1053–1067, 2006.

BROWN, J. & MORRA, M.J. Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests 2000–2002. **National Renewable Energy Laboratory**, 2005.

CARLI, M.C. Compostos Orgânicos Voláteis e em extrato aquoso de alho no controle de *Meloidogyne incognita*. **Dissertação**. Mestrado em Fitopatologia. Universidade Federal de Lavras – UFLA, p. 52, 2011.

CHARCHAR, J.M. Nematoides em Hortaliças. Concórdia: **Embrapa Hortaliças**, p. 12, 1995. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 18).

CHARCHAR, J.M.; VIEIRA, J.V.; FACION C.E. Controle de nematoides das galhas em cenoura através de rotação. **Fitopatologia Brasileira**. 25 (suplemento): 335 (Resumo). 2000.

CHEN, S.Y. & DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 32, p. 117–121, 2000.

- CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 221–249, 2002.
- COUTINHO, M.M.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; et al. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. **Nematologia Brasileira**, v. 33, 169-175, 2009.
- DIAS, C.R.; SCHWAN, A.V.; EZEQUIEL, D.P.; et al. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 203-210, 2000.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; et al. Plant volatiles: recente advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.
- DUDAREVA, N. & PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 181-189, 2008.
- ESTUPIÑAN-LÓPEZ, L.; CAMPOS, V.P.; DA SILVA JÚNIOR, J.C.; et al. Volatile compounds produced by *Fusarium* spp. isolated from *Meloidogyne paranaensis* egg masses and corticous root tissues from coffee crops are toxic to *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, 2017.
- FARIA, J.M.S.; SENA, I.; RIBEIRO, B.; et al. First report on *Meloidogyne chitwood* hatching inhibition activity of essential oils and essential oils fractions. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 207-217, 2016.
- FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; et al. Manejo sustentável de fitonematoides, 1 ed., Viçosa: **Editora UFV**, p. 306, 2010.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...**Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**, 45, 2000. Anais...São Carlos, SP: SIB, p. 255-258, 2000.
- FRANZENER, G.; FRANZENER, A. S. M.; STANGARLIN, J.R.; et al. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.
- FREIRE, E.S.; CAMPOS, V.P.; OLIVEIRA, D.F.; et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, v. 44, p. 321-328, 2012.
- GARDIANO, C.G.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; et al. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) *Chitwood*, 1949. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 551-556, 2009.
- GAUGLER, R. & BILGRAME, A.L. **Nematode Behavior**, eds, cabi, New York, USA, 2004.
- GOMMERS, F. J. Biochemical interactions between nematodes and plants their relevance to control. Helminthological Abstracts, Series B, **Plant Nematology** , v. 50, n. 01, p. 9-24, 1981.

GRIMME, N.K.; SIKORA, R.A.; STROBEL, G.A.; et al. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato **Plant Disease**, v. 91, p. 220-225, 2017.

GU, Y.I.; MO, M.H.; ZHOU, J. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 2567-2575, 2007.

HUANG, Y.; XU, C.; MA, L.; et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 417-422, 2010.

HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

ISIDOROV, V. & JDANOVA, M. Volatile organic compounds from leaves litter. **Chemosphere**, Davis, v. 40, n. 9, p. 975-979, 2002.

ISMAN, M. Pesticides based on plant essential oils. **Pesticide Outlook**, v.10, p. 68-72, 1999.

JARDIM, I.N.; OLIVEIRA, D.F.; SILVA, G.H.; et al. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal of Pest Science**, v. 91, p. 479-487, 2017.

KERMANSZAI, R.; MCCARRY, B.E.; ROSENFELD, J. et al. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. **Phytochemistry**, v.57, p. 427-435, 2001.

KRISHNAKUMARI, M.K. & S.K. MAJUMDER. Studies on anthelmintic activities of seeds of *Carica papaya* Linn. **Annals of Biochemistry and Experimental Medicine**, v. 20, p. 551-556, 1960.

LEFF, J.W. & FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 1629-1636, 2008.

LIGHTLY, T.J.; PHUNG, R. R.; SORENSEN, J.L.; et al. Synthetic cystic fibrosis sputum medium diminishes *Burkholderia cenocepacia* antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* independently of phenylacetic acid production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 427-438, 2017.

LORD, J.S.; LAZZERI, L.; ATKINSON, H.J.; et al. Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 7882-7890, 2011.

MACHADO, A.C.Z. Nematoides devastam lavouras de soja. **Revista Campos e Negócios**, 2015. <http://www.revistacampoenegocios.com.br/nematoides-devastam-lavouras-de-soja/>. Accessed 10 June 2016.

MAYTON, H.S.; CLAUDIA, O.; VAUGHN, S.F.; et al. Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Phytopathology**, v. 86, p. 267-271, 1996.

MOREIRA, F.J.C.; SANTOS, C.D.G.; INECCO, R. Eclosão e mortalidade de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* raça 2 em óleos essenciais. **Ciências Agrônômicas**, v. 40, n. 3, p. 441-448, 2009.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; et al. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 195–201, 2007.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; et al. Uso de Sementes de Mamão e Solarização do Solo no Controle de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n.4, p. 253-259, 2008.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; et al. Incorporação de Farinha de Semente de Mamão ao Solo para o Controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 36, n.1-2, p. 25-31, 2011.

NICOL, J.M.; TURNER, S.J.; COYNE, D.L.; et al. Current nematode threats to world agriculture. **Genomics and molecular genetics of plant – nematodes interactions**, Cham (ZG), Switzerland: Springer Science, cap. 2, 2011.

NIST Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology, 2013. <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [accessed 5 June 2018].

Nunes, A.S.; Campos, V.P.; Mascarello, A.; et al. Activity of chalcones derived from 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde against *Meloidogyne exigua* and in silico interaction of one chalcone with a putative caffeic acid 3-O-methyltransferase from *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 661-668, 2013.

OJAGHIAN, M.R.; JIANG, H.; XIE, G.L.; et al. In vitro biofumigation of brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 28, p. 185-190, 2012.

OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Nematology**, v. 90, n. 07, p. 710-715, 2000.

PICHERSKY, E. & GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 10, p. 439-445, 2000.

PICKETT, J. A.; BRUCE, T. J.; CHAMBERLAIN, K.; et al. **Chemical ecology: from gene to ecosystem**; Dicke, M.; Takken, W., eds.; cap. 11, 2006.

PLOEG, AT. & STAPLETON, J.J. Glasshouse studies on the effects of time, temperature and amendment of soil with broccoli plant residues on the infestation of melon plants by *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematology**, v. 3, p. 855-861, 2001.

RAMACHANDRAN, S.; KUMA, S.S.; LARROCHE, C.; et al. Oil cakes and their biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000-2009, 2007.

RUIZ, J.; BILBAO, R.; MURILLO, M.B. Adsorption of different voc onto soil minerals from gas phase: influence of mineral, type of voc, and air humidity. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1079-1084, 1998.

RIGA, E.; LACEY, L.A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, v. 45, p. 380-385, 2008.

Robles, H. **Encyclopedia of Toxicology**. Third Edition. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, p. 929-931, 2014

ROHLOFF, J. & BONES, A.M., Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* putativeolfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1941–1955, 2005.

SALGADO, S. M.; CAMPOS, V.P.; CARDOSO, M.G.; et al. Ecloração e mortalidade de juvenis de segundo estadio de *Meloidogyne exigua* em óleos essenciais. **Nematologia Brasileira**, v. 27, n. 01, p. 17-22, 2003.

SANTIN, R.C.M. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. (**Tese de Doutorado**). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS). 2008.

SASSER, J. N. & FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Maryland: Society of Nematologists, p. 7-14, 1987.

SILVA, Carina Prado da. Estudos observacionais das principais fontes de emissão de compostos orgânicos voláteis (COV) em floresta intacta de terra firme na Amazônia Central. 2010. 91 f. **Dissertação** (Mestrado em Meteorologia, Climatologia, Hidrologia e Interação Biosfera-Atmosfera) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

SILVA, G.A. **Métodos alternativos de controle de fitonematoides**. RAPP, v. 19, 2011.

SILVA, J.C.P.; CAMPOS, V.P.; BARROS, A.F.; et al. Plant volatiles reduce the viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* either directly or when retained in water. **Plant Disease**, 2018 in press.

SIKORA, R.A. & FERNANDEZ, E. Nematode parasites of vegetables. In: LUC, M., SIKORA, R. A., BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2nd edition, CABI publishing, p. 319-392, 2005.

SLUSARENKO, A.J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant disease by natural products: allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, p. 313–322, 2008.

SOUSA, R.M.O.F.; ROSA, J.S.; SILVA, C.A.; et al. Larvicidal, molluscicidal and nematicidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. **Journal of Pest Science**, v. 88, p. 413–426, 2015.

STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; BOSENBECKER, V.K.; et al. Avaliação de Óleos Essenciais de Plantas Medicinais no Controle de *Meloidogyne gramínicola* em Arroz Irrigado. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 126-134, 2008.

TERRA, W.C.; CAMPOS, V.P.; PEDROSO, M.P.; et al. Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 112, p. 34-40, 2017.

TERRA, W.C.; CAMPOS, V.P.; MARTINS, S.J.; et al. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 106, p. 125–131, 2018.

TRUDGILL, D.L. & BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous rootknot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Phytopathology**, v. 39, p. 53-77, 2001.

ULLAH, I.; KHAN, A.L.; ALI, L.; et al. Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photorhabdus temperata* M1021§. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 127–133, 2015.

WANG, D.; ROSEN, C.; KINKEL, L. et al. Production of methyl sulfide and dimethyl disulfide from soil-incorporated plant materials and implications for controlling soilborne pathogens. **Plant Soil**, v. 324, p. 185-197, 2009.

ZASADA, I.A. & FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Nematology**, v. 93, p. 747-750, 2003.