



WENDEL OLIVEIRA MACIEL

**COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELO
ALHO SÃO RETIDOS EM ÁGUA E
CONTROLAM *Meloidogyne incognita***

LAVRAS – MG

2016

WENDEL OLIVEIRA MACIEL

**COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELO ALHO SÃO RETIDOS EM
ÁGUA E CONTROLAM *Meloidogyne incognita***

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS – MG

2016

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

Maciel, Wendel Oliveira.

Compostos voláteis emitidos pelo alho são retidos em água e controlam *Meloidogyne incognita* / Wendel Oliveira Maciel. – Lavras : UFLA, 2016.

51 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Água tóxica. 2. Nematóide de galha. 3. Macerado de alho. 4. *Allium sativum*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

WENDEL OLIVEIRA MACIEL

**COMPOSTOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELO ALHO SÃO RETIDOS EM
ÁGUA E CONTROLAM *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 20 de abril de 2016.

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Dr. Marcio Pozzobon Pedroso	UFLA
Dra. Maria Eloisa Salustiano	EPAMIG

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

LAVRAS – MG

2016

Ao Senhor de todos.

Ao meu pai, Girlaine Vieira Maciel e à minha mãe, Solange Maria Oliveira Maciel, por toda a dedicação e esforço para que eu pudesse conquistar mais esta vitória.

Aos meus filhos, Ythallo Martins Maciel e Yohan Martins Maciel.

Ao meu irmão, Girlaine Oliveira Maciel, pelo incentivo e apoio nos momentos em que pensei em desistir de tudo.

À minha amiga de todo o meu coração, Regina Aparecida Castro, que me calçou no momento que andava entre espinhos e me fortaleceu, erguendo-me com sua bondade e luz espiritual.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Professor Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação, compreensão, tranquilidade, incentivo e, acima de tudo, amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia (DFP/UFLA), pela transmissão de seus conhecimentos e ensinamentos.

Aos amigos de Laboratório de Nematologia, Aline Barros, Arinaldo Silva, Eduardo Freire, Júlio Cesar, William Terra, Lívia pimenta, Lilian Abreu, Liliana, Thaissa Farias, Gizeli Souza, Natália Monique, Luma Pedroso, Cleber Maximiniano, Tarley Luiz de Paula e Lenice, minha imensa gratidão e agradecimentos por ter tido a honra de conhecê-los.

Aos estagiários Letécia Lopes e Ivan, pela dedicação e apoio nos experimentos executados.

Amigas da Epamig, Ariana Bento, Carol Rezende e Eloisa.

Aos meus grandes amigos com os quais criei um laço de amizade, Breno Juliatti, Iselino Nogueira Alan Carlos, Nathan Moura Thiago Ferreira, Roberto Farias, Gabo Alvarez, Tati Carla, Mírian Rabelo, Rafaela Araújo e Marina de Resende.

Aos amigos da UFLA, Estélio Gadaga, Helon Santos, Yasmim Freitas, Larissa Bitencourt, Sueny França, Aurivan Soares, Gilmara Soares, Viviane Costa, Mirella de Almeida, Marileide Costa e Ana Maria dos Santos.

Ao secretário da pós-graduação em Fitopatologia, Kássio Ribeiro e ao professor de inglês, Thiago Rossi.

Quando você observar uma pessoa triste pelos cantos da solidão, nunca diga que o seu estado emocional é frescura, pois só quem sabe o que se passa em sua mente obscura é o seu tormento.

Wendel Oliveira Maciel

*Sertão chorou quando separou noites frias escuridão,
Sertão solidão.
Sertão virou bicho quando a luz do sol não teve mais em sua visão.
Sertão perdeu a graça, o xiquexique, o mandacaru, o pé de cabaça.
Sertão sentiu o desprezo, a seca do sul em forma de gelo.
Sertão rabiscou as cinzas que um dia foram calor.*

Wendel Oliveira Maciel

RESUMO

Os compostos orgânicos voláteis são importantes no relacionamento entre microrganismos, entre plantas e microrganismos, e são tóxicos a organismos fitopatogênicos, especialmente os fitonematoides. O nematoide *Meloidogyne incognita*, que tantos prejuízos causa em diversas culturas no Brasil e no mundo, apresentou elevada imobilidade e mortalidade de seus juvenis do segundo estágio (J₂), quando misturado ao macerado aquoso em várias concentrações de alho e em álcool 40% diluído em água, e na solução pura de álcool 40%, em vários períodos de exposição, entre 1 hora e 48 horas. Quando os voláteis emitidos pelas concentrações de macerado de alho, além do álcool 40% em mistura com o substrato, foram armazenados na superfície do substrato, causaram imobilidade de J₂ acima de 95% e mortalidade de 73% a 99%. Os J₂ expostos a esses voláteis e inoculados em tomateiros tiveram redução do número de ovos a partir 10 g de alho a 40 g macerados em água, além de 5 g de alho macerado em álcool 40% e na solução pura de álcool 40% em água, comparados ao controle. A infectividade dos J₂ submetidos aos mesmos tratamentos, exceção de 10 g de alho, foi reduzida significativamente comparada ao controle. A água que foi exposta a esses voláteis e misturada à suspensão de J₂ de *M. incognita* causou imobilidade de 95% a 100% e mortalidade de 74% a 99%, nos diversos tratamentos. A análise cromatográfica dos compostos voláteis dissolvidos no macerado seco, macerado aquoso e água tóxica de alho detectou a presença de 32 moléculas, distribuídas nas classes de álcool, aldeído e sulfurados. Os compostos mais intensos encontrados foram dissulfeto de metil alila, dissulfeto de dialila, 3-vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene, trissulfeto de dialila, dissulfeto de di (1 propenil) (trans), 2-propen-1tiol ou alitiol, sulfeto de metil alila, 2-etil-1 hexanal e dois compostos não identificados. A classe dos sulfurados foi a maior fonte de emissões, com 20 compostos. Na água exposta aos voláteis do alho foram encontrados 11 compostos, com dissulfeto de dialila e 2-etil-1-hexanol sendo os mais intensos. É a primeira vez que se caracterizam as moléculas do alho presentes na água exposta aos voláteis e ao macerado aquoso, tóxicas a fitonematoides.

Palavras-Chave: Água tóxica. Nematóide de galha. Macerado de alho. *Allium sativum*.

ABSTRACT

Volatiles are important in the relationship between microorganisms, among plants and microorganisms and are toxic to plant pathogenic organisms, especially plant parasitic nematodes. The nematode *Meloidogyne incognita*, which causes losses to several crops worldwide, including Brazil, showed high immobility and mortality of second stage juveniles (J₂) when mixed to aqueous solutions macerates of several garlic concentrations, in pure solution of alcohol 40% exposed to one to forty-eight hours. When volatile emissions from the diverse concentrations of garlic macerates beside alcohol 40% in mixtures with the substrate, were stored at the mixture surface, the volatiles either from garlic or to alcohol 40%, caused J₂ immobility above 95% and J₂ mortality 73% to 99%. The J₂ exposed to those volatiles and inoculated on tomatoes showed significant reduction of egg numbers from treatments of 10% garlic concentration to 40% (macerated) in water, beside 5 g of macerated garlic in alcohol 40% and plain solution of alcohol 40% in water compared to control. The J₂ infectivity obtained with the same treatments, except 10% of garlic, was significantly reduced also to control. Water which was exposed to those volatiles and mixed with J₂ suspension of *M. incognita*, caused immobility from 95% to 100% and mortality from 74% to 99% in all treatments. Chromatographic analysis and CGMS of diluted volatiles in exposed water to garlic emissions as well as in vapor phase and in aqueous macerated garlic, revealed the presence of 32 molecules mainly distributed to classes of alcohol, aldehyde and sulfates. The most intensive compounds were disulfide of methyl allyl, disulfide diallyl, 3-vinyl -1-2- dithiacyclohex - 5 - ene, trisulfite of diallyl, disulfite of di (1 propenyl) (trans), 2 - propen -1-thiol or alithiol, sulfite of methyl allyl, 2 ethyl -1- hexanal and one unidentified compound. The sulfur class of molecules was the greatest emission source. In the water exposed to garlic volatile emissions were found eleven compounds and the most intense were disulfite of diallyl and 2-ethyl-1-hexanol. This is the first characterization of volatile molecules diluted in water by simple exposure and toxic to plant parasitic nematode.

Keywords: Toxic water. Galls nematodes. Garlic macerate. *Allium sativum*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Nematoide de galhas e sua importância na agricultura	13
2.2	<i>Allium sativum</i> L., a mais cultivada no Brasil.....	14
2.2.1	Ação pesticida do alho	16
2.3	Compostos orgânicos voláteis presentes nas plantas e na natureza	18
2.4	O etanol como agente de controle de fitonematoides.....	20
2.5	Deteção de COVs tóxicos a nematoide utilizando cromatografia gasosa.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	22
3.2	Obtenção de extrato aquoso de alho	22
3.3	Extrato de alho na imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	23
3.4	Extratos de alho ou álcool 40% misturados ao substrato e infestados com <i>Meloidogyne incognita</i> , além dos efeitos de seus voláteis aos juvenis do segundo estágio.....	23
3.5	Imobilidade, mortalidade, infectividade e reprodução de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> aos voláteis emitidos pela mistura substrato e alho ou álcool 40%.....	25
3.6	Infectividade e reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> pelos ovos misturados ao substrato com extrato de alho ou álcool 40% em tomateiro	26
3.7	Exposição de água destilada e esterilizada aos voláteis de extrato de alho e seu efeito em juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	27
3.8	Análise dos dados e estatística.....	28
3.9	Identificação dos compostos voláteis presentes nos vapores do macerado aquoso do alho, do macerado seco do e na água exposta aos vapores do alho	28
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Extrato de alho em água ou em álcool 40%, além da solução de álcool 40% pura, isoladamente, na imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	31
4.2	Extrato de alho e solução pura de álcool 40% misturados ao substrato e infestados por <i>Meloidogyne incognita</i> e a emissão de seus voláteis ao juvenil de segundo estágio	34

4.3	Exposição de água destilada e esterilizada aos voláteis do macerado aquoso de extrato de alho e seus efeitos em juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	37
4.4	Caracterização molecular dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelos macerados em água de alho macerado seco de alho e na água que foi exposta aos COVs do macerado seco e aquoso	38
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Meloidogyne incognita, conhecido como nematoides de galhas, parasita diversas espécies de plantas em todo o mundo (PERRY; MOENS; STARR, 2009) e é responsável pelas grandes perdas na produção de alimentos no mundo (TRUDGILL; BLOCK, 2001). O seu controle é o desafio permanente para os produtores rurais e pesquisadores em todo o mundo, na busca de métodos mais baratos, eficazes e de baixo risco à saúde humana e ao meio ambiente.

Apesar de os nematicidas serem amplamente utilizados, a maioria causa toxicidade ao homem, à fauna e polui as águas superficiais e subterrâneas (PERRY; MOENS; STARR, 2009). Alternativas de controle têm sido buscadas visando diminuir os efeitos deletérios ao meio ambiente e a contaminação de produtos alimentícios. Neste contexto, o uso de resíduos vegetais tem sido uma boa alternativa no controle de fitopatógenos do solo (OKA, 2009). Em adição, surge o alho como opção com potencial de uso pelos produtores. No extrato aquoso de alho têm sido constatados compostos tóxicos a *M. incognita* (AMARAL et al., 2002; GUPTA; SHARMA, 1991). Estudos mostram atividades nematicidas do óleo de alho contra *Bursaphelenchus xilophilus* (PARK et al., 2005) e efeito antifúngico de extrato aquoso de alho contra fungos que atacam plantas (BIANCHI et al., 1997).

O etanol, utilizado comumente como agente desinfetante, apresenta solubilidade em água e é ótimo solvente. Por isso tem sido utilizado em preparações de extratos de plantas. Muitos extratos preparados com álcool têm apresentado melhoria da atividade nematicida, comparado ao aquoso (ABBA et al., 2009; DAWAR et al., 2007; TARIQ et al., 2007). Além dessas vantagens do etanol como solvente, ele também pode apresentar efeito nematicida, confirmado em testes preliminares.

O etanol pode aumentar a eficiência nematicida do alho macerado, podendo diminuir a dose requerida da sua aplicação no controle de fitonematoides e sua aplicação pode ser justificada na produção de alimentos orgânicos. Tanto o macerado de alho quanto o etanol emitem voláteis e seus efeitos nematicidas têm sido quase inexplorados até o momento e ainda pouco pesquisados. Moléculas voláteis emitidas pelo alho podem constituir esqueletos de compostos na síntese de produtos pela indústria.

A ação dos COVs emitidos pelo alho poderá ser mais bem explicada se esses COVs ficarem retidos em água a eles exposta e torná-la tóxica a fitonematoides. Água exposta a voláteis emitidos pelo fungo *Muscodor albus* tornou-se tóxica a juvenis do segundo estágio (J₂) de *M. incognita* (GRIMME et al., 2007). Porém, ainda não foram identificadas as moléculas voláteis que ficam retidas na água e que são tóxicas aos fitonematoides. No campo, a retenção dos COVs na água evitará a rápida perda desses compostos para o ar, aumentando o tempo de contato deles com o nematoide que está sempre envolto por uma película de água para estar vivo e móvel.

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito nematostático em *Meloidogyne incognita* dos compostos voláteis e de outras moléculas do macerado de alho em água e em álcool, como também do álcool 40% em água e seus vapores aos J₂, bem como identificar os compostos gasosos retidos na água, em forma gasosa e os emitidos pelo extrato aquoso de alho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nematóide de galhas e sua importância na agricultura

Nematóides são vermes filiformes pertencentes ao filo nematoda, presentes em abundância no solo. Conhecem-se aproximadamente 4.105 espécies de fitonematóides (HUGOT; BAUJARD; MORAND, 2001). Mundialmente, estima-se um prejuízo em torno de US\$100 bilhões anuais, sendo 70% dos danos provocados pelos fitonematóides atribuídos ao gênero *Meloidogyne*, inviabilizando, dessa forma, áreas de cultivos (SASSER; FRECKMAN, 1987). Além de causar prejuízos diretos, tais parasitas podem debilitar a planta e torná-la suscetível a outras doenças (MOLINARI, 2009).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* se inicia no ovo, onde ocorre a multiplicação celular, até chegar à formação do juvenil do primeiro estágio. Em seguida, é formado o J₂, que rompe a camada do ovo com o estilete, ficando livre no solo, com mobilidade para migrar até a raiz da planta e nela penetrar. Geralmente, a penetração ocorre pela coifa da raiz. Dentro da planta, o J₂ vai migrar até um local específico, induzindo a formação do seu sítio de alimentação no parênquima vascular (ZHAO; SCHMITT; HAWES, 2000).

Meloidogyne spp. provoca diversos sintomas nas plantas, como formação de galhas nas raízes, diminuição e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes na absorção e translocação de água e nutrientes, com surgimento de clorose e redução na parte aérea, resultando na redução da produção (TIHOHOD, 1993).

Apesar de os nematóides apresentarem importância como patógenos primários, podem também interagir com outros patógenos, pela predisposição das plantas à infecção por fungos ou bactérias. Os ferimentos causados durante a alimentação disponibilizam o acesso dos organismos aos tecidos radiculares

intercalares. Dessa forma, os danos causados pelos nematoides nas plantas são resultantes da habilidade parasitária própria, somada ao consórcio com outros fitopatógenos, produzindo doenças (MICHHEREFF et al., 2005).

O uso de substâncias nematicidas de origem sintética ainda é uma realidade no controle de fitonematoides. Isto se deve ao fato de que essas substâncias representam um meio mais viável e prático, sob o aspecto econômico, após o plantio da cultura (HAFEZ; SUNDARARAJ, 2000; MASHELA; SHIMELIS; MUDAU, 2008).

Devido à alta exigência do mercado, atualmente, utilizam-se métodos alternativos para o manejo de fitonematoides, como o uso de cultivares resistentes e rotação de culturas controle biológico, entre outros.

Mais de 200 organismos considerados inimigos dos fitonematoides já foram relatados, entre eles fungos, bactérias, nematoides predadores, tardígrados, colêmbolas e ácaros (KERRY, 1990). Os agentes biológicos presentes no ecossistema do solo apresentam importante particularidade na limitação ou na estabilização das populações dos nematoides, atuando por meio de mecanismos de competição, parasitismo e na produção de compostos tóxicos (LOPES et al., 2007).

Extratos ou resíduos produzidos por plantas com ação contra os fitonematoides são uma alternativa de manejo. Algumas espécies de plantas produzem substâncias com atividades nematicidas, que são exsudadas no solo, contribuindo para a redução desses patógenos.

2.2 *Allium sativum* L., a mais cultivada no Brasil

Há cerca de 5.000 anos o alho já era utilizado por civilizações egípcias e indianas, sendo uma das mais antigas hortaliças cultivadas. Além dessas civilizações, segundo escrituras, o alho era cultivado pelos chineses há 4000

anos (SIMON, 2004). O maior produtor mundial de alho é a China, com 20 milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012), seguida de Índia, Coreia do Sul, Rússia, Espanha, Tailândia e Ucrânia. Na América do Sul, o líder na produção é a Argentina, seguida do Brasil (RESENDE; PEREIRA, 2009).

Mesmo sendo o segundo maior produtor de alho da América do Sul, o Brasil importa alho da China praticamente o ano todo. Como consequência, pequenos produtores de alho têm deixado essa atividade, pois enfrentam ainda a competição com o alho argentino, principalmente os estados do sul do Brasil. No Brasil, o estado de Minas Gerais se destaca, apresentando a maior produção de alho, seguido de Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Distrito Federal e São Paulo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

O gênero *Allium* tem cerca de 750 espécies e, provavelmente, o maior gênero entre as monocotiledôneas petaloides. As espécies desse gênero são caracterizadas por apresentarem bulbos envoltos por túnicas membranosas, algumas vezes fibrosas, com tépalas livres ou semilivres, algumas vezes com inserções subginobásica do estilete no ovário, além de algumas espécies apresentarem quantidades significativas de sulfóxido de cisteína, composto responsável pelo cheiro e sabor forte que é característico do alho (FRITSCH et al., 2006). Trata-se de uma planta herbácea, com aproximadamente 50 cm de altura. Apresenta pseudocaulo formado por bainhas das folhas, nas quais se implantam em pequenos caules achatados. Em condições climáticas favoráveis, as gemas do caule apresentam desenvolvimento que forma cada bulbilho e o seu conjunto forma um bulbo. A formação dos bulbilhos é feita pela folha de proteção, pela folha de reserva e pela folha de brotação. Os bulbilhos ligam-se ao caule pela base, que são recobertos por várias folhas, que em conjunto formam a capa, que pode apresentar coloração branca, arroxeadada ou

amarronzada (SILVA; SILVA, 2009). Geralmente, na mesma planta, são produzidos de 6 a 15 bulbilhos. O alho é utilizado na culinária como condimento, além de medicamento homeopático, há centenas de anos, em todo o mundo.

A exigência climática da cultura é de temperaturas baixas para a ocorrência da bulbificação, sendo tolerantes a geadas. A temperatura e o fotoperíodo são fatores limitantes à produção e diferentes em relação a cada cultivar. O fotoperíodo tem que ser maior que o valor crítico da cultivar utilizada, e algumas cultivares necessitam de valor inferior a nove horas. As cultivares tardias (nobres) exigem um fotoperíodo de treze horas e clima com baixa temperatura para a ocorrência de bulbificação. Conforme a planta, há exigências de temperaturas entre 10 a 25 °C (SOUZA; MACÊDO, 2009).

Para possibilitar um plantio de cultivares nobres em regiões em que o termofotoperíodo não tem uma condição favorável que a cultura exige, utiliza-se a técnica de vernalização, em que ocorre o armazenamento do alho semente durante 40 a 60 dias em uma câmara, com temperaturas de 3 a 5 °C, com 70% a 80% de umidade.

A época do plantio ocorre entre os meses de fevereiro a julho, dependendo da cultivar plantada. A capacidade de campo da água do solo não pode ser inferior a 60% e, se o solo apresentar um teor de umidade maior do que o citado, pode ocorrer um superbrotamento.

2.2.1 Ação pesticida do alho

De origem asiática, o alho fez parte da dieta de civilizações gregas e babilônicas. Hipócrates, em seus relatos, descrevia suas propriedades medicinais, como laxante, diurético e para tratamentos de tumores uterinos (HARRIS et al., 2001).

Além de o alho ser utilizado como condimento, foram demonstradas, em estudos, evidências de ação antimicrobiana. Em séculos passados, na França, uma terrível praga assolou Marselha. Quatro homens condenados foram designados a retirar das ruas cadáveres que apresentavam contaminação pela peste negra (peste bubônica) e eles não apresentam nenhum quadro de infecção ao terem contato com os cadáveres. Segundo estudos, essa resistência foi atribuída ao consumo de alho e vinho (HANN, 1996).

O químico alemão Wertheim, em 1844, foi o pioneiro nos estudos químicos com o alho. Esses estudos foram realizados por processos de destilação a vapor, por meio do qual obteve um óleo com cheiro forte de bulbilhos de alho e atribuiu o nome de alilo aos hidrocarbonetos presentes no óleo (PEIXOTO, 1994). Esse destilado apresentou propriedades antimicrobianas, o que também foi obtido por Semmler (1892). Cavallito e Bailey (1944) apontaram o composto tiosulfinato de dialila como responsável pela ação antimicrobiana, denominando-o, em seguida, de alicina.

O bulbilho do alho apresenta o substrato alinina (S-alil-L-cisteína sulfóxido) que, ao ser macerado, produz uma mistura da enzima alinase, produtora do ácido tiosulfênico que, por dimerização espontânea, resulta na formação da alicina, responsável pelo cheiro forte característico do alho (SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008). A alicina é mais bacteriostática do que bactericida. Entretanto, apresenta semelhança em seu efeito tanto para bactérias gram-negativas como para gram-positivas (CAVALLITO; BAILEY, 1944).

A ação antimicrobiana do alho é questionada *in vivo* por apresentar alta instabilidade (AMAGASE et al., 2001). Bianchi et al. (1997) verificaram que os COVs de alho apresentam cadeias de constituição linear de aldeídos, sulfeto de alila e dissulfeto e demonstraram ser estáveis, após uma semana de preparação

em solução. Em várias pesquisas observou-se a ação biológica da alicina (PARK et al., 2005; SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008).

O uso de extrato ou óleo de alho pode ser considerado uma alternativa na agricultura para o controle de diversas doenças de plantas, inclusive as causadas por fitonematoides (BIANCHI et al., 1997; PARK et al., 2005; TARIQ; MAGEE, 1990). Segundo Park et al. (2005), óleos essenciais de alho apresentaram 100% de mortalidade de fêmeas e juvenis de *Bursaphelenchus xylophilus*. Já em trabalho realizado por Neves et al. (2005) não houve uma redução na eclosão de J₂ de *M. javanica*, ao utilizarem extratos cetônicos de alho. Extrato de alho tem apresentado resultados eficientes no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas. Biachi et al. (1997) observaram efeito antifúngico quando adicionaram extrato aquoso de pó de alho em meio batata, dextrose e ágar (BDA) em culturas de *R. solani*, *F. solanie* e *C. lindemuthianum*, os quais ficaram com as hifas danificadas. Já a adição do pó de alho às culturas de *F. solani* e *C. lindemuthiannum* aumentou significativamente a produção de conídios. Balestra et al. (2009), empregando extrato de alho em *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoriae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, constataram efeito antibacteriano em testes *in vitro* e *in vivo*.

2.3 Compostos orgânicos voláteis presentes nas plantas e na natureza

Diversos grupos químicos compõem o grupo dos compostos orgânicos voláteis (COVs), dos quais vários estão presentes nas plantas, constituindo 1% dos metabólitos envolvidos no metabolismo secundário (DUDAREVA et al., 2006).

Os COVs são moléculas que apresentam até 20 átomos de carbono, com alta pressão de vapor. Podem atravessar as membranas facilmente e são

liberados tanto na atmosfera como no solo (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Apresentam rápida difusão pelo movimento de solução aquosa e pelo fluxo em massa no perfil do solo (WHEATLEY, 2002). Entre os COVs estão incluídos gases de resíduos orgânicos na atmosfera, excluindo o dióxido de carbono e o metano, tendo como foco os hidrocarbonetos. Dessa forma, um grande número de grupos de derivados, tanto saturados como insaturados e oxigenados, está incluído nos COVs (isopreno e monoterpenos), como alcanos, alcenos, carbonilas, alcoóis, ésteres, éteres e ácidos (KESSELMEIER; STAUDT, 1999).

O solo, juntamente com detritos orgânicos, produz COVs, principalmente por meio do resultado do crescimento bacteriano e de fungos que o habitam (ISODOROV; JDANOVA, 2002). Os COVs produzidos por microrganismos servem como infoquímicos para a interação inter e intraorganismos, na interferência de sinais de comunicação célula-célula, possibilitando uma válvula de escape de carbono e promovendo crescimento e inibição de alguns agentes (KAI et al., 2009). Estudos envolvendo os COVs precisam de ambientes fechados. Para os estudos com plantas inteiras, o aparelho utilizado pode torná-lo oneroso. Técnicas muito simples têm sido utilizadas nos estudos de interação entre microrganismos. Estes testes têm sido empregados, em sua maioria, *in vitro*, avaliando a eclosão do J₂, a imobilidade e a mortalidade de J₂ *Meloidogyne* spp, pela exposição aos COVs de fungos, bactérias e macerados de plantas. No entanto, é preciso que haja mais estudos *in vivo* (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

Utilizando placas de Petri bipartidas, Freire et al. (2012) fizeram testes com diversos isolados fúngicos contra J₂ de *M. incógnita*, obtendo níveis de imobilidade acima de 78% de 6 isolados de *F. oxysporum*.

2.4 O etanol como agente de controle de fitonematoides

Em condições de estresse, muitos tecidos de plantas são conhecidos como produtores de etanol, com baixo fornecimento de oxigênio ou presença de inibidores respiratórios. Em condições naturais, vários tecidos de frutos e sementes também produzem etanol (COSSINS; BEEVERS, 1963).

Testes realizados *in vitro* demonstraram que o etanol, em sua fase volátil, inibiu o crescimento de *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum musae*, *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias e leveduras que causam podridão em frutos (UTAMA et al., 2002).

Em campo, a toxidez do etanol está sendo testada recentemente, principalmente devido ao fato de o etanol apresentar um efeito de inibição da germinação de plantas invasoras. Em aplicações de álcool no solo com cobertura plástica, observou-se alta redução na germinação das plantas invasoras depois de sete dias. Além disso, observou-se o efeito fumigante contra certos microrganismos presentes do solo, incluindo fitonematoides (KOBARA et al., 2007). Por apresentar excelente condição como solvente, o álcool é muito utilizado em preparações de extratos de plantas, muitos deles testados quanto ao seu efeito tóxico a fitonematoides. Em sua maioria, trabalhos realizados com extratos alcoólicos supostamente apresentaram melhores resultados quando comparados com extratos aquosos no antagonismo ao nematoide (ABBAS et al., 2009; DAWAR et al., 2007; TARIQ et al., 2007).

2.5 Detecção de COVs tóxicos a nematoide utilizando cromatografia gasosa

Os COVs têm sua composição complexa e necessitam de estudos em ambientes fechados, decorrendo de métodos sensíveis de amostragens para análise de suas moléculas. Dessa forma, é apropriada uma estática de gás por

adsorventes, seguida por uma dessorção térmica ou por solvente e separação por cromatografia e espectrometria de massa. A cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (CG/MS) permite analisar e identificar os COVs emitidos por plantas e microrganismos (D'ALESSANDRO; TURLINGS, 2006; THOLL et al., 2006).

São poucos os estudos na detecção de COVs tóxicos de plantas no controle de fitonematoides utilizando-se a técnica de CG/MS. COVs tóxicos a fungos já foram caracterizados em algumas espécies vegetais, como os aldeídos (acetaldeído, benzaldeído e cinamaldeído). Essas substâncias tiveram efeito tóxico em fungos e bactérias que causam doenças em frutos pós-colheita (UTAMA et al., 2002).

Freire et al. (2012), utilizando cromatografia gasosa, constataram, entre COVs tóxicos a J₂ de *M. incognita*, produzidos pelo isolado 21 de *Fusarium oxysporum*, a presença de cariofileno, 4-metil-2,6-di-teritbutilfenol, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil-2-etil-propanoato e acoradieno, além de outros COVs em menor quantidade. Também observaram que dois isolados de *Fusarium oxysporum* e um isolado de *F. solani* emitiram COVs, que provocaram a mortalidade de 88% a 96% dos J₂ de *M. incognita*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*

Populações puras de *Meloidogyne incognita* foram multiplicadas em tomateiro e mantidas em casa de vegetação por dois meses. As raízes contendo galhas foram separadas do solo e cuidadosamente lavadas em recipiente com água parada. A seguir, foram cortadas em pedaços de, aproximadamente, 1 cm de comprimento para a extração de ovos, conforme a técnica de Hussey e Barker (1973). Para isso, foram trituradas em liquidificador por 40 segundos, em solução de NaOCl a 0,5% e passadas em peneiras de 200 e 500 “mesh”. Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão: os juvenis do segundo estágio (J₂) eclodidos no segundo e no terceiro dia da montagem da câmara de eclosão foram utilizados nos ensaios.

3.2 Obtenção de extrato aquoso de alho

Bulbilhos de alho do grupo Roxo, subgrupo Nobre, Classe 6, Tipo Extra, foram adquiridos na rede de supermercados Rex, na cidade de Lavras, MG. Os bulbilhos de alho foram descascados, pesados e triturados em liquidificador, com água ou álcool 40% em água. Bulbilhos descascados e triturados foram utilizados nas concentrações de 5%, 10%, 20% ou 40% .100 mL⁻¹ de água ou de álcool 40%.

3.3 Extrato de alho na imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Bulbilhos de alho foram triturados em liquidificador nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 40%.100 mL⁻¹ de água ou 5%.100 mL⁻¹ em álcool 40%. Como testemunhas foram utilizadas água destilada e esterilizada e solução apenas de álcool 40% em água. Em cavidades de 300 µL de placa de polipropileno (ELISA) com 96 cavidades foram colocados 100 µL de extrato de alho em água ou em álcool 40%. Em seguida, foram colocados 20 µL de uma suspensão contendo, aproximadamente, 100 J₂ de *M. incognita*. Cada cavidade da placa ELISA foi vedada com parafilme, para evitar a dispersão dos COVs. Em seguida, as placas foram colocadas em incubadora, a 28 °C, por períodos de tempo de 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento. De cada cavidade contaram-se os J₂ móveis e imóveis diretamente na placa, em microscópio de objetiva invertida. A mortalidade dos J₂ foi avaliada pela adição de uma a duas gotas de solução de NaOH 1,0 mol/L por cada cavidade, conforme a técnica de Chen e Dickson (2000). Os J₂ que não tiveram movimentos ou pequenas contrações após a adição da solução de NaOH durante 2 minutos foram considerados mortos.

3.4 Extratos de alho ou álcool 40% misturados ao substrato e infestados com *Meloidogyne incognita*, além dos efeitos de seus voláteis aos juvenis do segundo estágio

Foram empregados copos plásticos descartáveis com capacidade de 500 mL, contendo 230 g de substrato Multiplant ®. Utilizou-se o extrato aquoso de alho, obtido conforme descrito anteriormente, nas concentrações de 5%, 10%,

20% e 40%.100 mL⁻¹ de água; 5% em álcool 40%.100 mL⁻¹, além das testemunhas, água destilada e esterilizada e solução de álcool diluído em água álcool 40%. Ao substrato foi misturada uma suspensão contendo 3.000 ovos de *M. incognita* em 1,0 mL de água. Os ovos foram colocados diretamente no substrato, juntamente com 50 mL do extrato aquoso ou alcoólico de alho ou 50 mL da solução álcool 40% ou 50 mL de água pura, e misturados sob agitação para homogeneização. Assim, os ovos sofreram efeitos de moléculas voláteis ou não. A umidade foi ajustada a 60% da capacidade de campo (cc). Para o estudo isolado do efeito dos COVs sem a interferência de possíveis moléculas não voláteis foi aterrado um tubo eppendorf, com capacidade de 1,5 mL, pela metade, na mistura substrato + extrato aquoso de alho + ovos. O copo contendo tal mistura foi envolvido completamente, em sua parte superior, com parafilme, vedando-o, formando, assim, uma câmara de gás na superfície pelas emissões da mistura. Foi colocada, na superfície interna do filme vedante parafilme, na posição oposta ao tubo eppendorf, uma fita adesiva de 2x2 cm, para aumentar a resistência à perfuração que, mais tarde, seria feita com uma agulha de seringa de 5 cm³, evitando aumentar o diâmetro do furo ou, até mesmo, provocar a ruptura do filme plástico (Figura 1).

Figura 1 - Técnica empregada no estudo dos COVs retidos na superfície do copo. A seta indica o microtubo aterrado antes de o copo ser vedado com parafilme. A seringa foi utilizada para injetar juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* na câmara de gás formada na superfície do copo com vedação plástica.



3.5 Imobilização de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* pela mistura de substrato e alho ou álcool 40%

Após três dias de vedação para a formação dos voláteis na câmara de gás na superfície dos copos, com uma seringa de 5 mL contendo uma agulha perfurante, injetaram-se 1,2 mL de uma suspensão contendo 700 J₂ de *M. incognita* por ml no interior do eppendorf. O orifício feito no parafilme, provocado pela perfuração, foi vedado com fita adesiva. Como controle, foi

utilizado o substrato sem adição do extrato aquoso de alho com a umidade ajustada para 60% da c.c., bem como o álcool sem mistura com alho.

A suspensão de J_2 ficou exposta, por 48 horas, aos voláteis e, então, foi retirado o parafilme do copo. Com uma pipeta automática, retiraram-se 0,2 mL com, aproximadamente, 100 J_2 da suspensão de 1,2 mL e distribuiu-se em placa ELISA, onde foi avaliada a percentagem de J_2 móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida. A mortalidade dos J_2 foi avaliada com adição de NaOH 1,0 mol/mL, conforme Chen e Dickson (2000).

Após a avaliação da imobilidade e da mortalidade dos J_2 , a mesma suspensão de inóculo foi inoculada em tomateiro. Para isso, a suspensão de, aproximadamente, 600 J_2 em 1 mL de água foi acrescida com 3 mL de água destilada e esterilizada. A suspensão foi distribuída em quatro furos ao redor da muda de tomateiro com 15-20 dias após plantio em bandeja de isopor com 72 células. Aos 30 dias, avaliou-se o número de galhas. O número de ovos por sistema radicular foi quantificado conforme a técnica de Hussey e Barker (1973).

3.6 Infectividade e reprodução de *Meloidogyne incognita* pelos ovos misturados ao substrato com extrato de alho ou álcool 40% em tomateiro

Cinco dias após a vedação do copo com a mistura substrato, ovos de *M. incognita*, extrato de alho ou álcool 40%, o parafilme plástico foi removido e plantada uma muda de tomateiro contendo quatro pares de folhas crescidas em bandejas de isopor com 72 células. Aos 30 dias após o transplantio, avaliou-se o número de galhas e de ovos por sistema radicular do tomateiro. Para isso, a parte aérea de cada planta foi cortada e o sistema radicular de cada planta, em seguida, foi separado cuidadosamente do solo. O solo retirado foi peneirado para recuperar o máximo de raízes perdidas. As raízes ainda intactas e aquelas

recuperadas do solo peneirado foram lavadas em recipiente com água parada, para evitar a perda de massas de ovos. No sistema radicular foi avaliado o número de ovos por sistema radicular pelo método de Hussey e Barker (1973).

3.7 Exposição de água destilada e esterilizada aos voláteis de extrato de alho e seu efeito em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Nesse ensaio foi utilizada placa plástica bipartida que permite a comunicação entre os compartimentos apenas pelo ar (FERNANDO et al., 2005).

Foi empregado extrato de alho nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 40%.100 mL⁻¹ de água, além de 5 g de alho em álcool 40%. Como testemunhas foram utilizados álcool 40% e água pura destilada e esterilizada. Sete mL de cada suspensão ou diluição foram colocados em um dos comportamentos da placa bipartida.

Para permitir a introdução do organismo teste (J₂) na câmara de gás já formada, foi feito um orifício voltado para o compartimento vazio da placa bipartida, apenas o suficiente para permitir a passagem da agulha de uma seringa de 5 ml. O orifício foi vedado com fita adesiva, para que não ocorresse o vazamento dos COVs formados. As bordas das placas foram vedadas com parafilme e as placas colocadas em incubadora, a 28 °C, durante três dias. Após esse período, injetou-se, através do orifício anteriormente feito, 1 ml de água destilada e esterilizada. O orifício foi vedado novamente com fita adesiva e as placas foram colocadas novamente em incubadora, a 28 °C, por 24 horas. A seguir, a placa foi aberta e a água foi recolhida e colocada em frasco plástico de 5 ml de capacidade com tampa rosqueada e, nele, pipetados 100 J₂ concentrados em uma suspensão aquosa de 1 ml. Os frascos foram vedados com parafilme e armazenados em incubadora, a 28 °C, por 24 horas. A seguir, o frasco foi aberto

e, com o auxílio de um microscópio de objetiva invertida, foram contados os J_2 móveis e imóveis e avaliadas a mortalidade e a imobilidade com adição de NaOH 1,0 mol.L⁻¹, conforme Chen e Dickson (2000).

3.8 Análise dos dados e estatística

Os experimentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e cinco repetições para as concentrações citadas. Os resultados foram previamente submetidos aos procedimentos de análise de variância do programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Em seguida, a normalidade dos resíduos foi realizada no programa Assitat (SILVA; AZEVEDO, 2009) por meio do teste de normalidade (Shapiro - Wilk). Uma vez submetidos e atendidos os pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da análise de variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$), procedeu-se, para as variáveis qualitativas de cada tratamento, à comparação pelo teste Scott e Knott (1974) ($P < 0,05$).

3.9 Identificação dos compostos voláteis presentes nos vapores do macerado aquoso do alho, do macerado seco do e na água exposta aos vapores do alho

A água foi exposta aos gases, por um período de 24 horas, em câmara fechada, conforme descrito anteriormente. Para análise das moléculas na fase gasosa, foram macerados 0,28% bulbilhos de alho em cadinho de porcelana sem adição de água, e colocados diretamente dentro frasco SUPELCO™SPME (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) de 80x28 mm, com tampa rosqueada e uma camada superior interna de silicone que garante a completa vedação. Para a análise do macerado aquoso foram macerados 0,28% bulbilhos de alho em cadinho, com a adição de 100 mL de água, colocando-se, logo em seguida, no

frasco supelco. Todas as amostras foram colocadas em incubadora, a 28 °C e deixadas por 24 horas.

No cromatógrafo a gás, os gases formados e liberados no ar, bem como aqueles dissolvidos em água, foram separados e determinaram-se as suas estruturas moleculares. Os COVs foram extraídos via *head space* e pela microextração em fase sólida (SPME) (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). Os seguintes parâmetros foram adotados: uma fibra DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno, carboxeno, polidemetilsiloxano), temperatura de extração de 55 °C com agitação da amostra em de 250 rpm, tempo da extração de 35 minutos e tempo de dissorção no injetor de 2 minutos. Foi usado um cromatógrafo a gás acoplado a um GC espectrômetro de massa GC-MS QP 2010 ULTRA (Shimadzu, Japan) de cromatografia a gás acoplado ao espectrofotômetro de massa equipado com injetor automático AOC-500 (Shimadzu, Japan) para líquidos e gases e coluna HP-5 (5% fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm para a separação e a identificação de COVs. A temperatura do injetor foi, em média, de 250 °C, interface de 240 °C e fonte de íons do detector de 200 °C.

O injetor foi operado no modo *splitless*, ou modo split 1:4, de acordo com a intensidade dos picos na amostra. Como gás de arraste foi utilizado o hélio (He) grau 5.0, com fluxo de 1.0 ml min⁻¹. A temperatura do forno do CG foi de 40 °C até 160 °C, a 3 °C min⁻¹ e, por fim, até 240 °C a 10 min⁻¹. Na identificação dos COVs das amostras, o espectro de massas de cada pico foi obtido por meio 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 entre os índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.)

(ADAMS, 2007; ROHLOFF; BONES, 2005). Para a comparação entre os espectros de massas, somente “espectro” com similaridade superior a 80% foi considerado. Os índices de retenção do experimento foram obtidos por meio da injeção de uma série homóloga de alcanos.

4 RESULTADOS

4.1 Extrato de alho em água ou em álcool 40%, além da solução de álcool 40% pura, isoladamente, na imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

O macerado de alho aquoso expressa a sua atividade tóxica com moléculas voláteis e não voláteis solúveis em água e em álcool, como demonstrado neste ensaio. O extrato de alho macerado em água em qualquer concentração e tempo de exposição causou imobilidade elevada nos J₂ de *M. incognita*, significativamente diferente do controle (água). No entanto, a concentração de 5% de alho macerado em água causou menor imobilidade de J₂ até 12 horas de exposição, porém, igualou-se às demais concentrações nas exposições de 24 e 48 horas. A concentração de 5% de alho macerado em álcool 40% diluído em água causou imobilidade e mortalidade de J₂ semelhante às mais elevadas concentrações de alho macerado em água em qualquer período de exposição. O álcool 40% causou efeito semelhante ao das concentrações elevadas de macerado do alho em qualquer período de exposição J₂ (Figura 2).

A mortalidade de J₂ de *M. incognita* foi próxima de 100% e semelhante nas concentrações macerado de água de 20% e 40%, em qualquer período de exposição do nematoide. O macerado de alho na concentração de 10% em água causou sempre maior ($p \leq 0,05$) mortalidade de J₂, comparado à dose menor (5%) e ao controle em qualquer período de exposição e foi semelhante aos demais tratamentos com altas concentrações de alho, a partir de 6 horas de exposição. A concentração com menor macerado em água (5%) causou sempre maior mortalidade de J₂, comparada ao controle, porém, foi sempre estatisticamente menor do que as demais, concentrações até 24 horas de exposição dos J₂ aos seus voláteis. Quando essa mesma concentração de 5% de alho foi macerada em

4.2 Extrato de alho e solução pura de álcool 40% misturados ao substrato e infestados por *Meloidogyne incognita* e a emissão de seus voláteis ao juvenil de segundo estágio

Neste ensaio ocorreu a separação das moléculas voláteis armazenadas na superfície do recipiente e testadas quanto à toxicidade a J₂ de *M. incognita* na câmara de gás formada. As demais moléculas somadas às voláteis dissolvidas em água foram testadas no substrato colocado no recipiente e misturadas com ovos de *M. incognita*.

Os compostos voláteis capturados na câmara formada na superfície do recipiente causaram imobilidade de J₂ acima de 95%, significativamente superior ao controle água, em um período de 48 horas de exposição dos nematoides em todas as concentrações de macerado de alho e do controle álcool 40%. A mortalidade dos J₂ aos voláteis emitidos por essas mesmas fontes varia de 73% a 99%. A imobilidade e a mortalidade do J₂ exposta aos voláteis da concentração de 5g de alho foram sempre menores, significativamente, em relação a todos os outros tratamentos (Figura 4).

Os J₂ expostos aos voláteis por 48 horas e inoculados em tomateiros demonstraram redução significativa da reprodução a partir da concentração de 10% de alho em qualquer das fontes de emissão dos voláteis (alho ou álcool 40%), comparados ao controle e a concentração de 5% de alho. As emissões dos voláteis a partir de macerado de alho na concentração de 20% e 40%, além do álcool 40% puro, causaram mais de 50% de redução no número de ovos, comparado ao controle significativamente diferente das demais (Figura 5). A infectividade, contudo, foi semelhante ao controle, quando os J₂ foram expostos aos voláteis de macerado 5% e 10% de alho, e diferente do controle nos demais tratamentos (Figura 5).

Os ovos de *M. incognita* expostos por 30 dias aos compostos de alho macerado em água, além da solução pura de álcool 40%, demonstraram infectividade (nº de galhas) e reprodução significativamente reduzidas em relação ao controle em qualquer dos tratamentos. Porém, os menores valores ($P \leq 0,05$) foram obtidos quando reuniu-se solução pura do álcool 40%, tanto para as avaliações de infectividade quanto de reprodução, como demonstrado na Figura 6.

Figura 4 - Porcentagem de imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* expostos aos vapores dos compostos orgânicos voláteis na superfície do recipiente que recebeu diversas concentrações de macerado de alho, além da solução pura do álcool 40%.

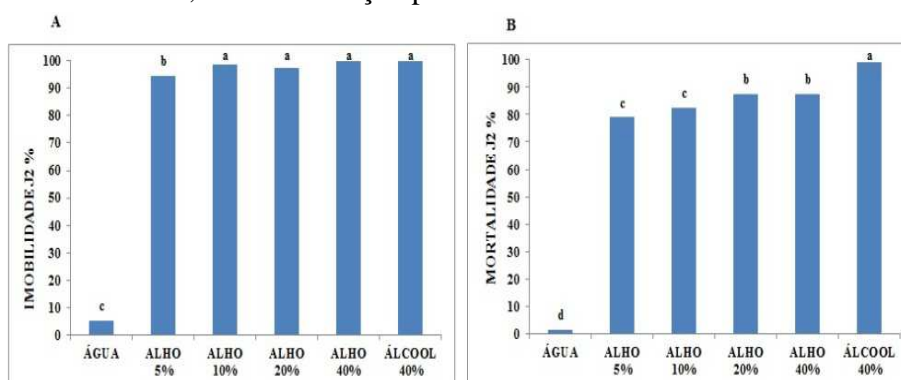


Figura 5 - Infectividade de juvenis do segundo estágio (J_2) e reprodução de *Meloidogyne incognita* avaliados por galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infestados por J_2 , após exposição aos voláteis por 48 horas.

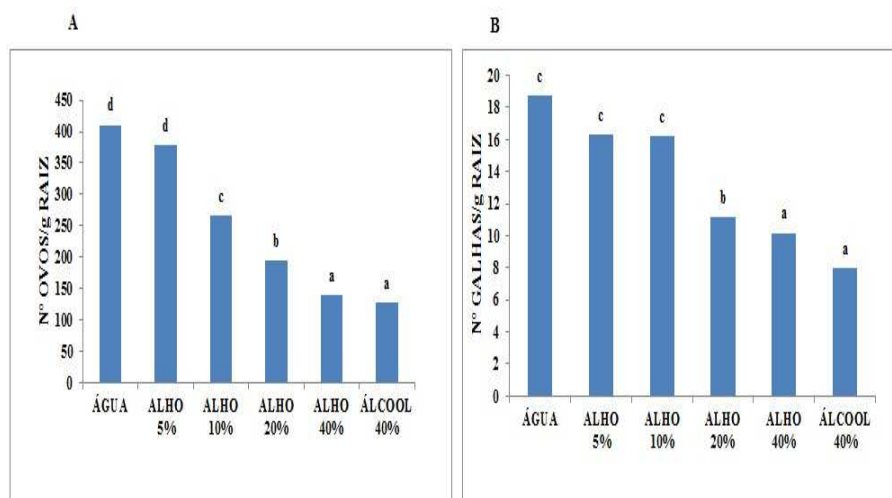
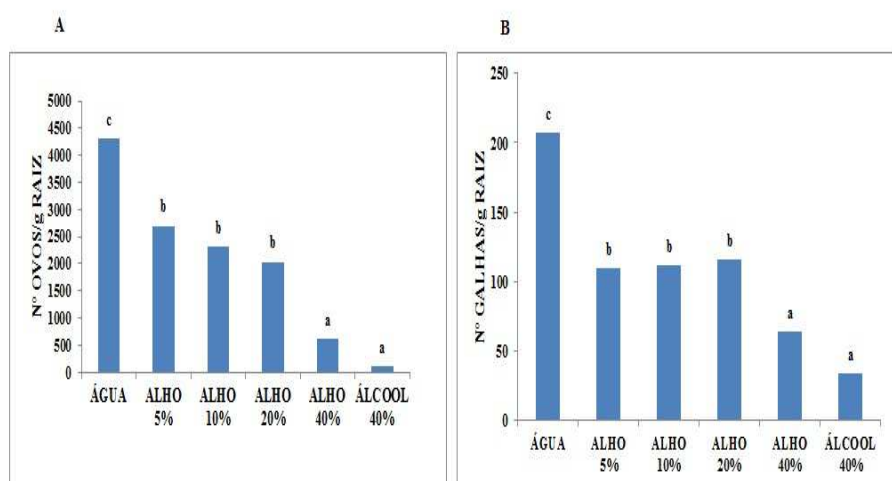


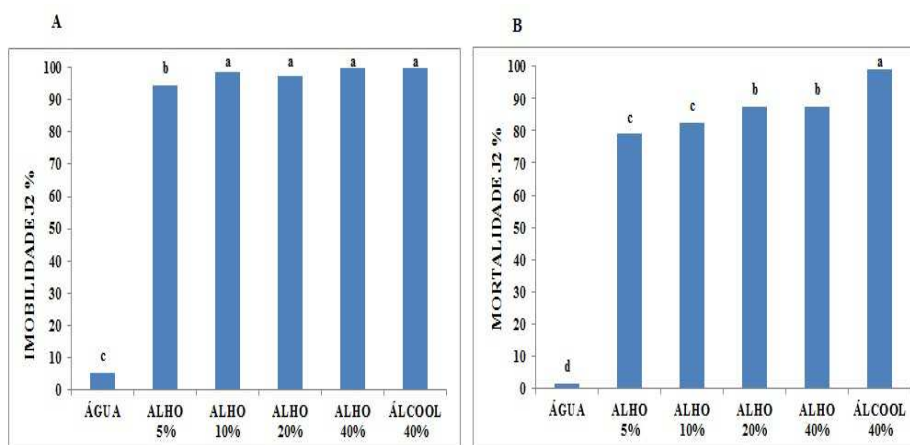
Figura 6 - Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros plantados nos recipientes com substrato misturado com ovos de *Meloidogyne incognita* e diversas concentrações água tóxica de alho, além de álcool 40%.



4.3 Exposição de água destilada e esterilizada aos voláteis do macerado aquoso de extrato de alho e seus efeitos em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Os J₂ misturados à água que foi exposta aos voláteis das diversas percentagens de macerado de alho e aos vapores de álcool 40% apresentaram redução ($P \leq 0,05$) da mobilidade e aumento ($P \leq 0,05$) da mortalidade, em comparação ao controle água. Entre as percentagens de macerado de alho, a menor redução da mobilidade ocorreu quando foram utilizados 5% de macerado, mas, mesmo assim, a redução chegou a 5% da mobilidade. A imobilidade dos J₂ misturados à água exposta aos vapores de álcool foi semelhante, quando foi utilizado macerado de alho de 10% a 40%. Entre as percentagens de macerado de alho, a mortalidade foi maior ($P \leq 0,05$) na água exposta aos voláteis de macerado de alho 20% e 40% e menor nas percentagens de 5% e 10%. Os vapores de álcool 40% causaram maior mortalidade de J₂, comparados a qualquer das percentagens de macerado de alho (Figura 7).

Figura 7 - Imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em água exposta aos voláteis emitidos por diversas concentrações de alho macerado em água e em álcool, além de álcool 40% isoladamente.



4.4 Caracterização molecular dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelos macerados em água de alho macerado seco de alho e na água que foi exposta aos COVs do macerado seco e aquoso

Foram encontradas 32 moléculas distribuídas principalmente nas classes de álcool, sulfurados e aldeídos, além de dois compostos não identificados. Essas moléculas foram detectadas nos vapores do macerado seco de alho, no macerado aquoso e na água exposta aos voláteis do macerado aquoso de alho. Dentre as classes de compostos, os sulfurosos contaram com maior número de moléculas, num total de 20. Todas as 20 moléculas sulfurosas foram encontradas no macerado seco de alho, sendo com sete delas em maior intensidade. Três moléculas sulfurosas foram encontradas dissolvidas na água exposta aos voláteis do alho, sendo o dissulfeto de dialila em maior intensidade. No extrato aquoso foram encontradas cinco moléculas sulfurosas, sendo também o dissulfeto de dialila em maior intensidade. Nos vapores do macerado seco do alho foram encontradas, no total, 25 moléculas diferentes. A maioria das moléculas encontradas na água expostas aos voláteis de alho estava também presente no extrato aquoso do alho, principalmente das classes álcool e aldeído. Na água exposta aos voláteis do alho ocorreram 11 moléculas com maior abundância de aldeídos, seguidos dos sulfurosos, número bem inferior ao extrato seco de alho. As moléculas de dissulfetos de dialila e 2-etil-1-hexanal foram encontradas em mais intensidade na água exposta aos voláteis do alho.

Tabela 1 - Compostos voláteis encontrados na água exposta aos voláteis de alho nos extratos aquoso e seco de alho analisados pelo GCMS.

Compostos		IR EXP	IR LIT	ÁGUA	SECO	AQUOSO
SULFURADOS						
1	Metanotiol	x	x		v	
2	2-Propen-1-tiol ou Alitliol	601	600		v	
3	Sulfeto de metil alila	695	697		v	
4	Dissulfeto de dimetila	736	744		v	v
5	Tetrahidrotiofano	769	775		v	
6	não identificado (sulfurado)	840	x		v	
7	Sulfeto de dialila	854	848	v	v	v
8	Dissulfeto de metil alila	914	908	v	v	v
9	Dissulfeto de di(1 propenil) (cis)*	927	923		v	
10	dissulfeto de di(1 propenil) (trans)*	1111	1102		v	
11	Trissulfeto de dimetila	966	955		v	v
12	Metanotiosulfinato s-metila	981	983		v	
13	Dissulfeto de dialila	1087	1082	v	v	v
14	Trissulfeto de metil alila	1147	1135		v	
15	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene/	1187	1185		v	
16	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene/decanal	1187	1185		v	
17	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	1216	1214		v	
18	Trissulfeto de dialila	1303	1300		v	
19	Tetrassulfeto de metil alila	1545	1555		v	
20	Tetrassulfeto de dialila	1545	1555		v	
ÁLCOOL						
1	Etanol	x	x	v		v
2	2 – propen – 1 - ol	x	x		v	
3	2-etil-1-hexanol	1028	1029	v		v
ALDEÍDO						
1	2-Propenal	x	x	v	v	v
2	2-metileno-4-pentenal	743	x	v	v	v
3	Hexanal	801	801	v	v	v
4	Octanal	1002	998	v		v
5	Decanal	1202	1201	v		v
OUTROS						
1	Propano	x	x		v	
2	Nonanoato de etila	1385	1381	v		v
3	não identificado	1336	x			v
4	não identificado	1375	x			v

* Identificados por índice de retenção (IR) da literatura experimental, pois espectro de massas correspondia ao isômero dialila (Zogbi, Dziri).

Os compostos com maior intensidade estão destacados em azul.

V – Moléculas presentes.

X os picos foram intensos e, dessa forma, não foi possível a identificação do composto pela cromatografia gasosa, mas apenas uma suspeita de que é o composto apresentado na tabela.

5 DISCUSSÃO

A aquisição da toxicidade a fitonematoides pela simples exposição da água ao macerado de alho indica a ocorrência da dissolução na água de moléculas polares e a retenção delas por mais tempo na solução aquosa, propiciando maior contato com o nematoide que estaria nela em suspensão. Dessa forma, moléculas polares das emissões de COVs do alho são mais retidas (dissolução) na água em reação aos aromáticos e alifáticos (RUIZ; BILBAO; MURILO, 1998). Portanto, os compostos encontrados na água exposta aos vapores do alho têm solubilidades em água superiores àquelas que estavam presentes apenas na fase gasosa. A diferença na solubilidade entre compostos voláteis cria um filtro. Por isso menor número de moléculas foi encontrado na água exposta, em comparação com o macerado seco de alho (Tabela 1). Outro fator que pode aumentar a solubilidade de gases na água é a ocorrência de surfactante natural. Espera-se que os voláteis do alho, que se dissolvem na água nos ensaios feitos neste trabalho, contamine a água rizosférica, quando o macerado de alho é aplicado no solo. A água ocupa a porosidade nos solos rizosféricos e os nematoides se beneficiam dela para envolver seu corpo cartilaginoso e poderem movimentar-se pelo solo. A contaminação da água da rizosfera com moléculas tóxicas aos fitonematoides conduzirá à redução de sua população e, conseqüentemente, à redução dos prejuízos às culturas. A água exposta aos voláteis emitidos pelo fungo *Muscodor albus*, torna-se tóxica a *Meloidogyne incognita* (GRIMME et al., 2007).

A dissolução de moléculas tóxicas voláteis na água do solo propicia a atuação dos compostos voláteis do alho, bem como dos vapores do etanol (40%), aqui testados a longa distância do local produzido, como já foi postulado para a atuação dos compostos voláteis por Wheatley (2002).

A identificação por cromatografia gasosa das moléculas voláteis dissolvidas e retidas em água do macerado de alho abre perspectivas para novas pesquisas sobre a natureza nematicida de cada uma delas. É a primeira vez que se caracterizam moléculas voláteis dissolvidas e retidas em água com toxicidade a fitonematoide, o que motiva a comparação da ocorrência delas em emissões gasosas de plantas e de microorganismos. Inúmeras plantas produzem variadas quantidades de compostos de baixo peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006), sendo 1% desses metabólitos moléculas lipofílicas que apresentam baixo ponto de ebulição e alta pressão de vapor à temperatura ambiente (DUDAREVA et al., 2006).

Em trabalhos realizados por Sultana et al. (2014) demonstrou-se que o contato de J₂ de *Meloidogyne incognita* com o composto de acetato de etila a 1%, por 24 horas, causou 69% de mortalidade e, em 48 horas de exposição, chegou a 97% de mortalidade.. Etanol foi avaliado, *in vitro*, contra *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum musae*, *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas aeruginosae*, e demonstrou efeito germistático contra todos os organismos estudados (UTAMA et al., 2002).

O etanol, volátil, é produzido pelo isolado *Muscodor albus*, patenteado (US 20140086879 A1) (GRIMME et al., 2007), e está presente nas emissões de neen e com toxicidade a J₂ *M. incognita* (BARROS et al., 2014). Os compostos 2-etil-hexanol e hexanal estão presentes nos compostos voláteis emitidos pela mostarda e tóxica ao J₂ de *M. incognita* (BARROS et al., 2014). Silva (2009) identificou, por meio de cromatografia gasosa, os compostos dissulfeto de dimetila trissulfeto de dimetil compostos sulfurados presente no óleo essencial comercial de alho. Também foram caracterizados em cultivar de alho dissulfeto de dimetila e trissulfeto de dimetila. Em cultivares de cebola foram identificados 2-ethyl-hexanol e dissulfeto de dialila (SILVA, 2009). Os aldeídos encontrados nas emissões de alho neste trabalho apresentou inibição de crescimento fúngico

e bacteriano em trabalhos realizados por (UTAMA et al., 2002). Também na biofumigação, aldeídos são liberados e têm atividade biocida. No entanto, as moléculas também presentes na água expostas aos voláteis de alho, como sulfeto de dialila, dissulfeto e metil alila, não têm sido encontradas nas emissões gasosas de nenhuma outra planta.

Além dessas três moléculas sulfurosas e voláteis encontradas na água exposta aos voláteis do alho, outras onze moléculas sulfurosas foram também encontradas nas emissões gasosas e ainda desconhecidas nas emissões de outras plantas. Dentre as emissões sulfurosas gasosas encontradas na fase gasosa, sete delas em alta emissão, como sulfeto de dialila, encontrado na água exposta aos voláteis do alho, podem aumentar a toxicidade a fitonematoides, em comparação com a emissão de outras plantas. De fato, compostos puros de sulfeto de dialila, trissulfeto de dialila e sulfeto de dialila já demonstram alta toxicidade aos nematoides *Bursaphelenchus xylophilus*, com maior toxicidade pelo trissulfeto de dialila a esse nematoide (PARK et al., 2005).

O número mais restrito de moléculas dissolvidas na água exposta aos voláteis do alho, em comparação às emissões gasosas, também ocorre com o extrato aquoso. Assim, o macerado seco de alho propicia mais emissões gasosas do que o macerado na presença de água (Tabela 1). Foram encontrados mais compostos em macerado seco do alho que no aquoso e com maior toxicidade aos J₂ de *M. incognita* dos COVs emitidos pelo extrato seco do alho, em comparação ao aquoso (CARLI, 2011).

A dissolução dos vapores do álcool 40% na água a eles exposta, tornando-a tóxica a J₂ de *M. incognita*, não foi constatada, ainda, por outros pesquisadores. No entanto, a capacidade tóxica a fitonematoides do álcool 40% tem sido comprovada (PATANANAN et al., 2015), Kobara et al. (2007), estudando o efeito provocado pelo álcool aplicado no solo com uma cobertura plástica, observaram alta redução na germinação das plantas invasoras depois de

7 dias da aplicação do etanol. Além disso, observaram ,ainda, o efeito fumigante contra certos microrganismos presentes no solo, incluindo fitonematoides.

A toxicidade do álcool 40%, separadamente, se soma à toxicidade do alho, quando macerado neste líquido. Extratos alcoólicos apresentaram melhores resultados, quando comparados aos extratos aquosos no antagonismo a nematoide. No entanto, novas pesquisas precisam ser feitas com concentrações de álcool inferiores às aqui estudadas, para definir o aumento da eficácia do macerado de alho em etanol, sem confundir com o efeito isolado deste álcool como nematicida. Extrato de alho em água tem demonstrado efeitos nematicidas e fungicidas (AMARAL et al., 2002; BIANCHI et al., 1997; GUPTA; SHARMA, 1991). Também o óleo de alho é tóxico ao nematoide *Bursaphelenchus xilophilus* (PARK et al., 2005).

6 CONCLUSÕES

O contato direto do macerado aquoso do alho e solução pura de álcool 40%, teve tanto efeito nematostático como nematicida aos juvenis do segundo estágio (J₂) de *M. incognita*.

Os vapores emitidos alho e álcool 40% em câmara de gás resultaram na diminuição da infectividade de J₂ *M. incognita*.

A água exposta aos COVS emitidos pelo alho macerado em água, alho macerado em álcool 40% e solução aquosa pura de álcool 40% tornou-se tóxica aos J₂ de *M. incognita*

A análise cromatográfica no macerado aquoso de alho, nas emissões gasosas na água exposta aos vapores de alho, detectou a presença de 32 moléculas e, na sua maioria, moléculas sulfuradas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. et al. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 5, p. 2625-2632, 2009.
- ADAMS, R. P. New natural products isolated from one-seeded Juniperus of the Southwestern United States: isolation and occurrence of 2-Ethenyl-3-Methyl phenol and its derivatives **Journal of Oil Research**, Benin City, v. 19, p. 146-152, Mar./Apr. 2007.
- AMAGASE, H. et al. Intake of garlic and its bioactive components. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 955-962, 2001.
- AMARAL, D. R. et al. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *M. exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 43-48, fev. 2002.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- BALESTRA, G. M. et al. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. **Crop Protection**, Guilford, v. 28, n. 10, p. 807-811, Oct. 2009.
- BARROS, A. F. et al. Tempo de exposição de juvenis do segundo estágio a voláteis emitidos por maceração de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, Bradenton, v. 44, n. 2, p. 190-199, 2014.
- BIANCHI, A. et al. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi "in vitro". **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 11, p. 1241-1246, Nov. 1997.
- CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 525-535, maio/jun. 2010.
- CARLI, M. C. **Compostos orgânicos voláteis em extrato aquoso de alho no controle de *Meloidogyne incognita***. 2011. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CAVALLITO, C. J.; BAILEY, H. J. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* in: isolation, physical properties and antibacterial action. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1950-1951, Nov. 1944.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v. 32, n. 1, p. 117-121, Feb. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Alguns aspectos da importação de alho pelo Brasil**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/>>. Acesso em: 10 out. 2014.

COSSINS, E. A.; BEEVERS, H. Ethanol metabolism in plant tissues. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 38, n. 4, p. 375-380, 1963.

D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T. C. J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **Analyst**, London, v. 131, p. 24-32, 2006.

DAWAR, S. et al. Use of Eucalyptus sp., in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 6, p. 2209-2214, 2007.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417-440, Sept. 2006.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, May 2005.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Ed. UFCar, 2000. p. 255-258.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee Rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 44, n. 4, p. 321-328, Dec. 2012.

FRITSCH, R. M. et al. The genus *Allium* (Alliaceae) in Iran: current state, new taxa and new records. **Rostaniha**, Tehran, v. 7, p. 256-282, 2006. Supplement 2.

GRIMME, E. 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**, Quebec, v. 91, p. 220-225, 2007.

GUPTA, R.; SHARMA, N. K. Nematicidal properties of garlic, *Allium sativum*. **Indian Journal Nematology**, New Delhi, v. 21, n. 1, p. 14-18, June 1991.

HAFEZ, S. L.; SUNDARARAJ, P. Efficacy and persistence of nematicides against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 10, n. 1, p. 37-40, 2000.

HANN, G. History, folk medicine, and legendary uses of garlic. In: KOCH, H. P.; LAWSON, L. D. (Ed.). **Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L., and related species**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. p. 37-107.

HARRIS, J. C. et al. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 282-286, Oct. 2001.

HUGOT, J. P.; BAUJARD, P.; MORAND, S. Biodiversity in helminthes and nematodes as a field study: an overview. **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 199-208, July 2001.

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

ISODOROV, V.; JDANOVA, M. Volatile organic compounds from M. Volatile organic compounds from leaves litter. **Chemosphere**, Davis, v. 48, n. 9, p. 975-979, Sept. 2002.

KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, Jan. 2009.

KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 621-631, Oct. 1990.

KESSELMEIER, J.; STAUDT, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmospheric Chemistry**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 23-88, May 1999.

KOBARA, Y. et al. Possibility of the new soil fumigation technique with ethanol solution. In: ANNUAL RESEARCH CONFERENCE ON METHYL BROMIDE ALTERNATIVES AND EMISSIONS REDUCTION, 2007, San Diego. **Proceedings...** San Diego, 2007. p. 74.

LOPES, E. A. et al. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 20-26, maio 2007.

MASHELA, P. W.; SHIMELIS, H. A.; MUDAU, F. N. Comparison of the efficacy of ground wild cucumber fruits, aldicarb and fenamiphos on suppression of the root-knot nematode in tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, p. 264-267, 2008.

MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENENZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Ed. UFRPE, 2005. p. 1-18.

MOLINARI, S. Antioxidant enzymes in (a) virulent populations of root-knot nematodes. **Nematology**, College Park, v. 11, p. 689-697, 2009.

NEVES, W. S. et al. Atividade de extrato de alho (*Allium sativum*), mostrada (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 273-278, 2005.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic amendments. **Review Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 101-115, Feb. 2009.

PARK, I. K. et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Nematology**, College Park, v. 7, p. 767-774, 2005.

PATANANAN, A. N. et al. Ethanol-induced differential gene expression and acetyl-CoA metabolism in a longevity model of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 20-30, Jan. 2015.

PEIXOTO, F. M. C. Alguns aspectos químicos do odor. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, Lisboa, n. 52, p. 30-32, 1994.

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot nematodes**. Cambridge: CABI, 2009. 488 p.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Oxford, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

RESENDE, G. M.; PEREIRA, A. J. Importância econômica. In: SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. S. (Ed.). **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Lavras: Ed. UFLA, 2009. p. 11-19.

ROHLOFF, J.; BONES, A. M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*: putative olfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 66, p. 1941-1955, 2005.

RUIZ, J.; BILBAO, R.; MURILO, M. B. Adsorption of different VOC onto soil minerals from gas phase: influence of mineral, type of VOC, and air humidity. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 32, n. 8, p. 1079-1084, 1998.

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, 1987. p. 7-14.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SEMMLER, F. W. Über das atherische ol des knoblauchs (*Allium sativum*). **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 230, n. 6, p. 434-443, 1892.

SILVA, A. A. **Caracterização de organossulfurados em diferentes cultivares de alho (*Allium sativum* L.) e cebola (*Allium cepa* L.)**. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.

SILVA, E. C.; SILVA, R. J. Botânica e cultivares. In: SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. J. (Ed.). **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Lavras: UFLA. 2009. p. 21-28.

SILVA, F. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assitat-estatistical assistance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno. **Proceedings...** Reno, 2009. p. 21-25.

SIMON, P. W. **The origin and distribution of garlic: how many garlics are there?** 2004. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=5232>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

SLUSARENKO, A. J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant diseases by natural products: allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, n. 3, p. 313-322, July 2008.

SULTANA, N. et al. Effect of different concentrations of *Eriobotrya japonica* extract on control of infection by *Meloidogyne incognita* and *Cephalobus litoralis*. **Journal of Entomology and Nematology**, Nairobi, v. 6, n. 2, p. 27-31, Feb. 2014.

TARIQ, M. et al. Use of *Rhizophora mucronata* in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode on okra and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 1, p. 265-270, 2007.

TARIQ, V. N.; MAGEE, A. C. Effect of volatiles from garlic bulb extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. **Mycological Research**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 617-620, 1990.

THOLL, D. et al. Practical approaches to plant volatile analysis. **Plant Journal**, Shannon, v. 45, p. 540-560, 2006.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: Ed. FUNEP, 1993. 372 p.

TRUDGILL, D. L.; BLOCK, V. C. Apomitic, polyphago root-knot view of nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annals Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 39, p. 53-77, 2001.

UTAMA, I. M. S. et al. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 22, p. 6371-6377, Oct. 2002.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediate bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, p. 357-364, Nov. 2002.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Ohytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, Nov. 2000.