



**MARCELA DE FREITAS SILVA**

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS  
VOLÁTEIS DE *Cymbopogon nardus*, *Dysphania ambrosioides*,  
*Nasturtium officinale* e *Passiflora edulis* À *Meloidogyne*  
*incognita***

**LAVRAS – MG  
2018**

**MARCELA DE FREITAS SILVA**

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Cymbopogon nardus*, *Dysphania ambrosioides*, *Nasturtium officinale* e *Passiflora edulis* À *Meloidogyne incognita***

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

Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador  
Dr<sup>a</sup> 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).

Silva, Marcela de Freitas.

Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de *Cymbopogon nardus*, *Dysphania ambrosioides*, *Nasturtium officinale* e *Passiflora edulis* à *Meloidogyne incognita* / Marcela de Freitas Silva. - 2018.

84 p.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Coorientador(a): Aline Ferreira Barros.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Nematóide das galhas. 3. COVs de plantas. I. Campos, Vicente Paulo. II. Barros, Aline Ferreira. III. Título.

**MARCELA DE FREITAS SILVA**

**TOXICIDADE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Cymbopogon nardus*, *Dysphania ambrosioides*, *Nasturtium officinale* e *Passiflora edulis* À *Meloidogyne incognita***

**TOXICITY OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF *Cymbopogon nardus*, *Dysphania ambrosioides*, *Nasturtium officinale* and *Passiflora edulis* 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 em Fitopatologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de abril de 2018

Dr. Marcio Pozzobon Pedroso

Dra. Aline Ferreira Barros

Dr. Alex Oliveira Botelho

UFLA

UFLA

IF SUDESTE MG

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2018**

*Ao meu avô, Jair Nunes da Silva, por ter sempre acreditado no meu potencial para o caminho dos estudos.*  
*À minha prima, Camilla Silva Andrade, minha eterna “Abelha”, que sempre torceu e comemorou todas as minhas conquistas.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me permitir realizar este sonho e obter mais uma conquista.

Aos meus pais, Deusdante Aparecido da Silva e Sandra Maria de Freitas Silva, por todo carinho, amor e incentivo.

À minha irmã, Paula de Freitas Silva, pela amizade e estímulo.

Ao meu namorado, Danilo Machado, pelo apoio, paciência e amor.

As famílias Freitas e Silva, por todo o carinho e por celebrarem mais essa vitória ao meu lado.

À prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Nilvanira Tebaldi, por me incentivar a trilhar novos horizontes em busca de novos conhecimentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos professores do DFP, por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

Ao prof. Dr. Vicente Paulo Campos e à Dr.<sup>a</sup>. Aline Ferreira Barros, pela orientação e ensinamentos.

Ao prof. Dr. Márcio Pozzobon Pedroso, pela colaboração nas análises químicas do projeto.

Ao pessoal do Horto de Plantas Mediciniais da UFLA, Giulia Nayara Duarte, Paulo Vitor Ferreira e Leandro Simão, por toda prestatividade.

Ao pessoal do Laboratório de Nematologia, em especial à Vanessa Alves Gomes, Fabíola de Jesus Silva, Willian César Terra, e aos estagiários, Júlio César Justino e Clério Rodrigues Ribeiro, pela amizade e ajuda no desenvolvimento e análises do projeto.

Aos demais colegas do DFP, em especial ao Lucas Guedes Silva, Paul Esteban Perez Perrony e Larissa Carvalho Ferreira, pela amizade e companheirismo.

Á todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por órgãos vegetais podem indicar novos nematocidas. As toxicidades a fitonematoides de emissões voláteis de *Plantago major*, *Physalis* sp., *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Ruta graveolens*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon nardus*, *Eugenia uniflora*, *Momordica charantia*, *Ocimum gratissimum*, *Petiveria alliacea*, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus viridis*, *Dysphania ambrosioides*, *Anacardium occidentale*, *Mentha piperita*, *Nasturtium officinale* e *Passiflora edulis* ainda não haviam sido estudadas. Para isso, inicialmente, foi realizado um *screening* com as plantas estudadas individualmente, através da técnica desenvolvida com frasco Supelco™. As espécies de plantas que apresentaram maior toxicidade aos J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita* foram selecionadas para estudos posteriores. Desta forma, as menores quantidades (0,2 g) dos macerados das espécies *P. edulis*, *N. officinale* e *C. nardus* emitiram COVs que causaram altas imobilidades de J<sub>2</sub>. No entanto, apenas os COVs emitidos por *C. nardus* e *D. ambrosioides* causaram mortalidade de *M. incognita*. As águas destiladas expostas aos COVs emitidos por *C. nardus*, *D. ambrosioides* e *N. officinale* por 72 h causaram imobilidades significativas em J<sub>2</sub>, porém, somente os COVs emitidos por *N. officinale* causaram mortalidade significativa, quando comparados ao controle. Após a exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs emitidos pelas 4 espécies vegetais que mais destacaram-se, foi realizada a inoculação em tomateiros. Ocorreram redução no número de galhas e ovos após 45 dias da inoculação. Também foi observado redução no número de galhas e ovos em tomateiros, através do processo de biofumigação, utilizando-se os macerados das 4 espécies vegetais incorporados ao substrato inoculado com ovos de *M. incognita*. A análise por cromatografia gasosa revelou a presença de 85 moléculas emitidas por macerados de *C. nardus*, *D. ambrosioides*, *N. officinale* e *P. edulis*, sendo feita a seleção de 5 moléculas para testes de toxicidades, individualmente, a *M. incognita*. Somente 1-Octanol, identificada na emissão gasosa de *N. officinale*, apresentou atividade nematocida.

**Palavras chave:** Biofumigação. Nematóide das galhas. COVs de plantas. Bioprospecção.

## ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) emitted by plant organs may indicate new nematicides. Phytonematoids toxicities of volatile emissions of *Plantago major*, *Physalis* sp., *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Ruta graveolens*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon nardus*, *Eugenia uniflora*, *Momordica charantia*, *Ocimum gratissimum*, *Petiveria alliacea*, *Portulaca oleracea*, *Amaranthus viridis*, *Dysphania ambrosioides*, *Anacardium occidentale*, *Mentha piperita*, *Nasturtium officinale* and *Passiflora edulis* had not yet been evaluated. To do this, initially, a screening was performed with the plants individually studied, through the technique developed with Supelco<sup>TM</sup> flask. The plant species that showed the highest toxicity to J<sub>2</sub> of *Meloidogyne incognita* were selected for further studies. Thus, as smaller amounts (0,2 g) of *P. edulis*, *N. officinale* and *C. nardus* macerates emitted VOCs that caused high immobility of J<sub>2</sub>. However, only the VOCs emitted by *C. nardus* and *D. ambrosioides* caused mortalities of *M. incognita*. The distilled water exposed to VOCs emitted by *C. nardus*, *D. ambrosioides* and *N. officinale* for 72 hours caused significant immobility in J<sub>2</sub>, however, only VOCs emitted by *N. officinale* caused significant mortality when compared to control. After an exposure of the J<sub>2</sub> to the VOCs emitted by the 4 most stood out plant species, an inoculation was carried out in tomatos. The number of galls and eggs after 45 days of inoculation were reduced. It was also observed reduction in the number of galls and eggs in tomatoes, through the biofumigation process, by using the macerated of the 4 plant species incorporated to the substrate inoculated with eggs of *M. incognita*. Gas chromatographic analysis revealed the presence of 85 molecules emitted by macerated of *C. nardus*, *D. ambrosioides*, *N. officinale* and *P. edulis*, and 5 molecules were selected for toxicity tests to *M. incognita*, individually. Only 1-octanol, identified in the gas emission of *N. officinale*, showed nematicidal activity.

**Keywords:** Biofumigation. Root knot nematode. Plants VOCs. Bioprospecting.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Importância e manejo dos fitonematoides.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Algumas Plantas com efeito nematicida .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1. Erva de Santa Maria – <i>Dysphania ambrosioides</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2. Citronela – <i>Cymbopogon nardus</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.3. Agrião – <i>Nasturtium officinale</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.4. Maracujá – <i>Passiflora edulis</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. O que são compostos orgânicos voláteis e a toxicidade a fitonematoides.....</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....</b>	<b>27</b>
<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>27</b>
<b>Compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas medicinais no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>58</b>
<b>Voláteis emitidos por agrião e maracujá são tóxicos a <i>Meloidogyne incognita</i>.....</b>	<b>58</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

A agricultura é o setor com maior crescimento na economia brasileira. É responsável por 23,5% do Produto Interno Bruto (PIB), além de gerar 93 mil empregos diretamente, contribuindo com o desenvolvimento socioeconômico do país (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL - CNA, 2017). Dessa forma, o Brasil é considerado um dos principais países com destaque no agronegócio mundial, sendo o terceiro maior exportador de produtos agrícolas, superado apenas pelos Estados Unidos e pelos países que compõem a União Europeia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DO COMÉRCIO - OMC, 2017). Portanto, é necessário que o setor agropecuário nacional busque cada vez mais aumentar a sua produtividade. Porém, um fator relevante no decréscimo da produtividade é o ataque de pragas e doenças, que em muitos casos limitam a produção e podem causar perda de qualidade e segurança dos produtos agrícolas (MONTESINOS, 2007, p. 1).

O controle químico tem sido uma estratégia de manejo de pragas e doenças economicamente viável, causando efeito imediato e ajudando a reduzir as perdas na produtividade (COOPER; DOBSON, 2007). No entanto, grande parte dos produtos disponíveis no mercado, principalmente os nematicidas, apresentam alta toxicidade ao homem e ao meio ambiente, ocorrendo a retirada de alguns deles, como ocorreu com o aldicarb em 2012 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2012; PASSOS; REIS, 2013).

Ainda é limitada a introdução de novos produtos para substituir os nematicidas retirados do mercado, sendo que poucas moléculas novas foram produzidas após 1970 (MCCARTER, 2008, p. 240). A dificuldade de se encontrar novas moléculas com atividade nematicida se depara com novas barreiras impostas pela sociedade e pela ecologia, pois precisam ser menos tóxicas aos animais e não deixar nenhum resíduo nos alimentos. (JARDIM et al., 2017). Assim, nos últimos anos houve intensificação de pesquisas por novas moléculas tóxicas a fitopatógenos em plantas e resíduos vegetais (SILVA, 2016, p. 8).

Surgiram assim, relatos na literatura que mostram o efeito de moléculas de diferentes espécies vegetais contra fitopatógenos (SANTOS et al., 2013; BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; REGNIER et al., 2014; NEERAJ et al., 2017), destacando-se os

compostos orgânicos voláteis (COVs) que são tóxicos a microrganismos, como por exemplo, os fitonematoides e respondem positivamente aos anseios da sociedade, pois aparentemente não deixam resíduos nos alimentos após aplicação (CABONI et al., 2013; BARROS et al., 2014a; JARDIM et al., 2017). De fato, as plantas produzem mais de 1700 COVs (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006) que contribuem para sua defesa atuando como substância antimicrobiana ou atraindo agentes de controle biológico (DUDAREVA et al., 2006).

A identificação por cromatografia gasosa das emissões voláteis tóxicas a fitopatógenos aumentaram bastante na última década (JARDIM et al., 2008; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; BAI; LIU; LIU, 2011; CABONI et al., 2012, 2013; AGUIAR et al., 2014; AISSANI et al., 2015; SILVA et al., 2017), sendo relatadas várias moléculas tóxicas a fitonematoides (BAI; LIU; LIU, 2011; FIALHO et al., 2012; AISSANI, et al., 2015; TERRA et al., 2018). Os testes com moléculas voláteis avançaram de testes *in vitro* para testes *in vivo* em casa de vegetação e campo, incluindo os trabalhos com biofumigação e água tóxica pela exposição aos voláteis (BARROS et al., 2014a, 2014b; LÓPEZ et al., 2017a, 2017b; JARDIM et al., 2017; TERRA et al., 2017).

Também nos últimos anos foram desenvolvidas técnicas para testes de compostos voláteis utilizando, por exemplo, o tubo Supelco<sup>TM</sup>, muito empregado para análise de amostras por cromatografia gasosa (BARROS et al., 2014a). Outra técnica foi desenvolvida para estudar os efeitos exclusivos dos voláteis aprisionados na superfície da mistura de solo com substrato da fonte emissora, no processo de biofumigação (BARROS et al., 2014a, 2014b; LÓPEZ et al., 2017a). Como novidade para a Nematologia, o fitonematoide teste é sempre introduzido na câmara de gás, já formada, através de uma seringa. Esse novo método abriu caminho para estudos de sensibilidade do fitonematoide à rápida exposição ao volátil (BARROS et al., 2014a, 2014b; LÓPEZ et al., 2017a, 2017b; SILVA et al., 2017; TERRA et al., 2017, 2018). Ademais, essas moléculas poderiam ser sintetizadas como nematicidas no mercado.

Considerando a alta demanda da sociedade por alimentos, além das perdas de produção que os fitopatógenos podem causar, objetivou-se neste trabalho encontrar compostos orgânicos voláteis de plantas tóxicos a *Meloidogyne incognita*, com menor impacto para o ambiente e a saúde humana.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1.Importância e manejo dos fitonematoides

Os fitonematoides são parasitas de tecidos vegetais, principalmente de raízes, capazes de causarem diferentes níveis de danos, podendo levar as plantas a morte (FERRAZ; BROWN, 2016). Já foram descritas mais de 1400 espécies de fitonematoides, muitas delas responsáveis por perdas quantitativas e qualitativas dos alimentos, com prejuízos na produção de culturas estimados em 157 bilhões de dólares anualmente para a agricultura mundial (ABAD et al., 2008; JONES et al., 2013). Dentre os fitonematoides, destaca-se o gênero *Meloidogyne* com 98 espécies conhecidas que parasitam quase todas as plantas cultiváveis através da formação de sítios de alimentação no tecido vegetal, formando galhas e alterando a fisiologia da planta (JONES et al., 2013; MACHADO, 2014, p. 26). As espécies de *Meloidogyne* são consideradas fitonematoides de maior importância mundial, principalmente nas regiões tropicais, com as espécies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*, causando maiores prejuízos (MACHADO, 2014, p. 28; FERRAZ; BROWN, 2016).

O controle de fitonematoides é um dos mais difíceis de se realizar em comparação com outros fitopatógenos, já que é praticamente impossível erradicá-los da lavoura infestada. A forma de controle mais empregada são os produtos químicos, porém grande parte dos nematicidas disponíveis no mercado têm a eficiência questionada pelos produtores, além de poluírem o meio ambiente e serem tóxicos à humanos e animais (ANVISA, 2012). No entanto, os métodos de controle são variados, dentre eles, podem ser utilizados cultivares resistentes, controle biológico, rotação de culturas com plantas não hospedeiras, alqueive úmido e solarização do solo (ARAÚJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012). Porém, nem sempre essas técnicas são efetivas ou aplicáveis a diversas culturas ou regiões (OKA, 2014, p. 1851; FERRAZ; BROWN, 2016). Dessa forma, muitos pesquisadores passaram a estudar estratégias para o controle de fitonematoides baseados em substâncias fitoquímicas no intuito de desenvolver nematicidas obtidos de produtos derivados de plantas (CHITWOOD, 2002, p. 223; NTALLI; CABONI, 2012).

Já foram relatadas muitas substâncias com propriedades nematicidas produzidas por plantas antagônicas (FERRAZ; FREITAS, 2004), em que o uso delas no controle de

fitonematoides pode ser explorado através da adubação verde, biofumigação, óleos essenciais e extratos vegetais. Algumas plantas das famílias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae* e *Poaceae* estão entre as mais estudadas em relação às propriedades antagonicas aos fitonematoides, com utilização em rotação de culturas e incorporação no solo (INOMOTO, 2008, p. 5; AIRES et al., 2009; SILVA, 2011, p. 83). O gênero *Tagetes* da família *Asteraceae* é um dos mais estudados no controle alternativo de fitonematoides, podendo ser utilizado em rotação de culturas, consorciação, incorporados ao solo ou até mesmo aplicado na forma de extrato aquoso, como relatado por Ferreira, Silva e Nascimento (2013), onde a eclosão de J<sub>2</sub> de *M. incognita* foi reduzida em 91%. Diferentes espécies e variedades da família *Poaceae* também têm sido exploradas no controle de fitonematoides, principalmente de *Meloidogyne* spp. Carneiro et al. (2006) avaliaram a resistência de treze espécies de gramíneas a *Meloidogyne* spp. e observaram que entre as plantas estudadas, apenas *Eleusine indica* não foi resistente a *M. incognita* e *M. paranaensis*.

## **2.2. Algumas Plantas com efeito nematicida**

Plantas medicinais e aromáticas também apresentam ação nematicida, sendo que a sua utilização no controle desses patógenos é explorada principalmente através de óleos essenciais e extratos. Óleos essenciais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) mostraram eficiência no controle de nematoides (MOREIRA et al., 2015; MATTEI et al., 2014; CETINTAS; YARBA, 2010). Dessa forma, é importante identificar os compostos orgânicos produzidos pelas plantas e que podem atuar no metabolismo secundário com atividade de fitoproteção, atração de polinizadores e adaptação ambiental (TAIZ; ZIEGER, 2004). E podem demonstrar ainda ação nematicida de seus compostos orgânicos voláteis (COVs) (DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2009; BARROS et al., 2014a; AISSANI et al., 2015).

### **2.2.1. Erva de Santa Maria – *Dysphania ambrosioides***

*D. ambrosioides*, conhecida popularmente como Erva de Santa Maria (ESM) ou Mastruz, é uma planta medicinal utilizada para tratar problemas digestivos e respiratórios. Possui propriedades anti-inflamatórias, antimicrobiana, anti-helmíntica, sendo utilizada na medicina veterinária para o controle de verminoses, e antifúngica atuando no controle

de fungos como *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Fusarium* (JARDIM et al., 2008; OLIVEIRA; FERREIRA; BARROSO, 2014).

Há relatos na literatura sobre o efeito nematicida de ESM a diferentes espécies de fitonematoides, principalmente quando utilizado o seu extrato e óleo, ou quando a planta é incorporada no solo. Mello, Machado e Inomoto (2006) observaram que a mortalidade da população de *Pratylenchus brachyurus* foi maior quando utilizaram extrato de ESM em comparação com o controle químico (aldicarb). Já Corbani e Mazzonetto (2013) observaram a redução de galhas e ovos em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) quando aplicado extrato aquoso de ESM no solo.

A planta possui metabólitos secundários como compostos fenólicos, catequinas, esteroides, flavononas, taninos e triterpenoides, sendo considerados os princípios ativos responsáveis por suas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA; FERREIRA; BARROSO, 2014). Dentre eles, existem os compostos voláteis cuja composição química emitida por ESM é formada majoritariamente por ascaridol além de outros compostos como p-cimene, isoascaridol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineno. Porém, há relatos de que a sua composição pode sofrer influência de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Na Nigéria, por exemplo, o  $\alpha$ -terpineno é considerado o componente principal no óleo essencial da planta, enquanto que no Brasil, o ascaridol é encontrado em maior quantidade (SÁ; SOARES; RANDAU, 2015).

O ascaridol pertence à classe dos monoterpenos bicíclicos e seu efeito antiparasitário ocorre devido a ação inibitória de parasitas intestinais, fazendo com que os mesmos se desprendam do tecido no qual estão inseridos. É um composto ativo contra nematelmintos que infectam humanos, animais e algumas plantas (OLIVEIRA; FERREIRA; BARROSO, 2014). Torres et al. (2008) avaliaram o efeito de ascaridol, emitido por *Croton regelianus*, sobre *M. incognita*, obtendo resultado positivo de controle. Também, Bai, Liu e Liu (2011), relataram que (Z)-ascaridol possui alta atividade nematicida contra *M. incognita*, sem avaliarem o efeito de emissões voláteis de ESM.

Trabalho recente, como o de Martins e Santos (2016), mostra a eficiência *in vitro* e *in vivo* de ESM no controle de *M. incognita*, sem estudar o efeito de COVs. Neste estudo, juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) foram expostos por 48 horas ao extrato aquoso de folhas de ESM na concentração de 5%, ocorrendo a inativação de 100% da população e após 24

horas ocorreu a mortalidade total dos J<sub>2</sub>. A ausência de galhas nas raízes de tomateiros inoculados confirmou o efeito tóxico do extrato.

Apesar de existirem trabalhos na literatura sobre o efeito nematicida de ESM e sobre a sua composição química, ainda faltam estudos que relatem o efeito das emissões gasosas produzidas pelo macerado das folhas de ESM no controle de fitonematoides, bem como a composição dessas emissões e a toxicidade de cada molécula emitida à *M. incognita*.

### 2.2.2. Citronela – *Cymbopogon nardus*

*C. nardus* é uma planta originada do Ceilão e da Índia que pertence à família *Poaceae* (SEIXAS et al., 2011). É popularmente conhecida por seu efeito repelente a insetos, além de ser utilizada por indústrias farmacêuticas, cosméticas e como chá calmante e digestivo. Possui propriedades antifúngicas, antissépticas e antibacterianas e o seu óleo tem como constituintes majoritários citronelal, citronelol e geraniol (SHASANY et al., 2000; CASTRO et al., 2010, WEI; WEE, 2013).

O citronelal é um monoterpenoide responsável pelo aroma acentuado de limão do óleo de citronela. É usado para a síntese de compostos denominados de iononas e na síntese de vitamina A, além de ser utilizado pelas indústrias de cosméticos (CASTRO et al., 2010; MELO et al., 2010; SAIBABU et al., 2017). Possui propriedades repelentes e antifúngicas, tendo relatos da sua eficiência no controle de fungos fitopatogênicos como *Aspergillus* sp., *Fusarium subglutinans*, *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum musae* (SEIXAS et al., 2011; AGUIAR et al., 2014). Também há trabalhos sobre a sua atividade nematicida, apenas estudado *in vitro*, no controle de *M. incognita* e *Bursaphelenchus xylophilus* (ECHEVERRIGARAY; ZACARIA; BELTRÃO, 2010; CHOI et al., 2007).

Assim como o citronelal, o citronelol é um composto aromático de interesse para indústrias farmacêuticas e cosméticas, com características antibacterianas, antifúngicas, anti-espasmódicas e anticonvulsivante (BRITO et al., 2012). Existem estudos que evidenciam o efeito de citronelol no controle de nematoides. Abdel-Rahman, Alaniz e Saleh (2013) utilizaram o nematoide modelo *Caenorhabditis elegans* para testar a atividade nematicida de fitoterpenoides, sendo que alguns dos compostos que apresentaram melhor resultado foram carvacrol, timol,  $\alpha$ -terpineno e citronelol. Citronelol também foi efetivo no controle *in vitro* de *Pratylenchus penetrans* e *M.*

*javanica*, causando a mortalidade de 87 e 100% da população, respectivamente (TSAO; YU, 2000; ANDRÉS et al., 2012).

Já o geraniol é um monoterpeneo com aparência de um óleo amarelado insolúvel em água, porém solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Possui odor característico de rosa, sabor cítrico agradável e por isso é considerada uma das principais moléculas utilizadas pelas indústrias de cosméticos. Além disso, apresenta propriedades inseticidas, repelentes, terapêuticas, com potencial para o desenvolvimento de remédios contra o câncer, antimicrobianas e anti-helmínticas (MÜLLER et al., 2009; CHEN; VILJOEN, 2010; CHO et al., 2016).

O uso de geraniol no controle de fitonematoides é bastante estudado (PARK et al., 2007; ECHEVERRIGARAY; ZACARIA; BELTRÃO, 2010; ANDRÉS et al., 2012; ABDEL-RAHMAN; ALANIZ; SALEH, 2013). Ntalli et al. (2011) observaram que o sinergismo entre trans-anetol e geraniol causou a mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. incognita*. Entre os 28 compostos presentes nos óleos de *T. vulgaris* testados no controle de *B. xylophilus*, geraniol apresentou alta atividade nematicida (KONG et al., 2007).

Apesar de existirem trabalhos sobre o efeito nematicida dos três principais componentes de citronela, ainda não há muitos estudos que relatem o controle de nematoides com as outras moléculas voláteis que estão presentes na sua composição em menor intensidade. Além disso, a composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários da planta pode ser modificada de acordo com a idade, reprodução, hormônios, estações do ano, horas do dia e condições de cultivo (CASTRO et al., 2010), o que justifica estudos em outras condições de crescimento da planta.

### **2.2.3. Agrião – *Nasturtium officinale***

O agrião, pertence à família das brássicas e é comercializado principalmente fresco, sendo bastante apreciado na culinária em saladas, sopas, sucos e outras receitas. Também é utilizado como planta medicinal por ser rico em vitaminas, minerais e isotiocianatos com propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas e antimicrobianas (CRUZ; VIEIRA; SILVA, 2008; POURHASSAN-MOGHADDAM et al., 2014).

Ainda não há muitos estudos sobre o uso de agrião no controle de doenças de plantas, porém alguns trabalhos já apontam que o extrato de folhas de agrião possui efeito contra

alguns fitopatógenos testados. Iseri et al. (2014) observaram que o extrato de agrião foi eficiente no controle *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* e *Pectobacterium carotovorum*. A inibição do crescimento de micélios de *Fusarium solani in vitro* também ocorreu com o uso de seu extrato alcóolico (NIKAN; KHAVARI, 2014).

No controle de fitonematoides, alguns estudos mostram a atividade nematicida de folhas de agrião sobre *Globodera rostochiensis* e *Meloidogyne hapla* através de extratos aquosos e *Globodera pallida* através da biofumigação (AIRES et al., 2009; LORD et al., 2011; ZAHRADNÍKOVÁ; PETŘÍKOVÁ, 2012). No entanto, vários trabalhos relatam o efeito de glucosinolatos e seus derivados, que são metabólitos secundários produzidos por brássicas neste controle (SERRA et al., 2002; AIRES et al., 2009; CABONI et al., 2012).

Os glucosinolatos são compostos sulfurosos produzidos por brássicas e quando hidrolizados pela enzima mirosinase, produzem compostos com atividade nematicida e fungicida, como o volátil isotiocianato (LAZZERI et al., 2004; BONES; ROSSITER; 2006; OJAGHIAN et al., 2012). Zassada e Ferris (2003) observaram que isotiocianato de 2-feniletilo e isotiocianato de fenilo foram eficientes no controle de *M. javanica* e *Tylenchulus semipenetrans*. No entanto, outras moléculas voláteis também podem estar relacionadas com o efeito tóxico a fitonematoides sendo, portanto, necessário estudá-las e testá-las.

#### **2.2.4. Maracujá – *Passiflora edulis***

*P. edulis*, popularmente conhecido como maracujá azedo, é nativo do Brasil e bastante utilizado principalmente pela indústria alimentícia na produção de sucos e polpas, gerando 54 mil toneladas de subprodutos descartados anualmente, incluindo sementes e cascas (VARGAS et al., 2013; SANTOS et al., 2015). A planta também possui propriedades terapêuticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e é utilizada como calmante e sedativo (ZUCOLOTTI et al., 2009; SILVA et al., 2013). A casca e semente do maracujá, resíduos da indústria de sucos, podem apresentar propriedades de interesse tecnológico e biológico (MARTÍNEZ et al., 2012), sendo que mais de 75% deste resíduo poderia ser transformado em ingrediente com propriedades bioativas para indústria farmacêutica (ARVANITTOYANNIS, 2008, p. 6).

Há poucos estudos que relatam o uso desses resíduos no controle de fitopatógenos. Xavier (2011, p. 60) observou que extratos da casca de maracujá induziram resistência

em plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria* através da ativação de enzimas de defesa. Peptídeos que foram isolados da semente de maracujá inibiram o crescimento de *F. oxysporum* e *Aspergillus fumigatus* (PELEGRINI, 2007, p 24). Já o óleo extraído da semente foi eficiente no controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (SILVA et al., 2014). Portanto, existe potencial tanto da casca quanto da semente de maracujá, que são descartadas pelas indústrias, no manejo de patógenos de plantas, sendo necessário a realização de estudos com outros fitopatógenos, como por exemplo, os fitonematoides.

### **2.3. O que são compostos orgânicos voláteis e a toxicidade a fitonematoides**

Compostos orgânicos voláteis (COVs) são moléculas com até 20 átomos de carbono que, por terem alta pressão de vapor, são capazes de se dispersar no ar e no solo (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA., 2006). Os COVs no controle de fitopatógenos têm merecido ênfase na última década com avanços consideráveis em técnicas e modo de ação (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; BARROS et al., 2014a, 2014b; TERRA et al., 2017, 2018). Por exemplo, trabalhos têm relatado o efeito nematicida de COVs produzidos por fungos e bactérias (FREIRE et al., 2012; XU et al., 2015; PIMENTA et al., 2017; LÓPEZ et al., 2017b; TERRA et al., 2017, 2018), torta de algodão, torta de semente de camélia, vapores de etanol (LÓPEZ et al., 2017a; YANG et al., 2015; SILVA et al., 2017) e também emissões gasosas do extrato e óleos essenciais de plantas (BARROS et al., 2014a, 2014b; JARDIM et al., 2017),

Estima-se que mais de 1700 COVs são produzidos por plantas (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006). Contudo, a ação de muitos deles no controle de nematoides ainda precisam ser esclarecidas. Aissani et al. (2015) avaliaram o efeito de COVs presentes em óleo essencial de rúcula (*Eruca sativa*) e observaram que compostos como erucina, isotiocianato de pentilo e hexil isotiocianato apresentaram toxicidade a *M. incognita*. Jardim et al. (2017) observaram que cinamaldeído, presente em óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*), controla *M. incognita* em plantas de soja (*Glycine max*). Faria et al. (2016) relataram o efeito de óleos essenciais de arruda (*Ruta graveolens*) e segurelhas-das-montanhas (*Satureja montana*) na redução da população de *Meloidogyne* em batata (*Solanum tuberosum*) e identificaram várias moléculas voláteis emitidas pelos óleos através de cromatografia gasosa.

Tem sido pesquisado o efeito de COVs emitidos por alguns macerados vegetais em fitonematoides. Barros et al. (2014a) relataram a ação nematicida de COVs emitidos por

macerado aquoso e macerado fresco de nim (*Azadirachta indica*) e mostarda (*Brassica juncea*), causando imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Silva (2012, p. 45) observou, *in vitro*, que COVs emitidos por macerados aquosos e frescos de inflorescência de brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), folhas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e citronela (*C. nardus*), sementes de girassol (*Helianthus annuus*) e castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) foram tóxicos a J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Em ambos os trabalhos, os autores observaram que a toxicidade dos COVs sempre foi mais elevada no macerado fresco do que no aquoso.

Ainda é grande o número de espécies vegetais não testadas com relação a produção de moléculas tóxicas a fitonematoides através de COVs. Assim, novos estudos de seleção de plantas e identificação de COVs emitidos por vegetais visando o controle de nematoides ainda irão surgir nos próximos anos. Moléculas voláteis, no futuro, podem se tornar nematicidas para a agricultura.

## REFERÊNCIAS

- ABAD et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, New York, v. 26, n. 8, p. 909 – 915. 2008.
- ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N. M.; SALEH, M. A. Nematicidal activity of terpenoids. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, Virginia, v.48, n. 1, p. 16-22, 2013.
- AGUIAR, R. W de. S. et al. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and Citronellal against three fungal species. **The Scientific World Journal**, London, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- AIRES, A. et al. Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, with extracts of brassicacea plants. **American Journal Potato Research**, Moses Lake, v. 86, p. 327–333, 2009.
- AISSANI, N. et al. Nematicidal activity of the volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.63, n.27, p. 6120-6125, 2015.
- ANDRÉS, M. F. et al. Nematicidal activity of essential oils: a review, **Phytochemistry Reviews**, The Netherlands, v. 11, n. 4, p. 371-390, 2012.
- ANVISA. 2012. Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/noticias>>. Acesso em: 27 dez. 2017.
- ARAÚJO, F. F de.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 220-224, 2012.
- ARVANITTOYANNIS, I. S. 1 - Potential and representatives for application of environmental management system (EMS) to food industries. In: IOANNIS, S.A. et al. (Ed.). **Waste management for the food industries**. Amsterdam: Academic, p. 3-38, 2008.
- BADAWY, M. E. I.; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 52, p. 776-782, 2014.
- BAI, C. Q.; LIU, Z. L.; LIU, Q. Z. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium Ambrosioides* aerial parts. **E-Journal of Chemistry**, Campo Grande, v. 8, n. 1, p. 143-148, 2011.
- BARROS, A. F. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, Florenza, n.80, p.34–43, 2014a.
- BARROS, A. F. 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**, Flórida, v. 44, n. 2, p. 190-199, 2014b.
- BONES, A. M.; ROSSITER, J. T.; The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, Nantes, v. 67, p. 1053–1067, 2006.

- BRITO, R. G de. et al. Prospecção tecnológica da utilização do citrônio. **Revista Geintec**, São Cristóvão, v. 2, n. 2, p.166-173, 2012.
- CABONI, P. et al. Nematicidal activity of 2-thiophenecarboxaldehyde and methylisothiocyanate from caper (*Capparis spinosa*) against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 7345–7351, 2012.
- CABONI, P. et al. Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, p. 9784-9788, 2013.
- 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, p. 525-535, 2010
- CARNEIRO, R. G. et al. Reação de gramíneas a *Meloidogyne incognita*, *M. paranaensis* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.3, p. 287-291, 2006.
- CASTRO, H. G. et al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.
- CETINTAS, R.; YARBA, M. M. Nematicidal effects of five plant essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* race 2. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Dubai, v.9, n.2, p. 222-225, 2010.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany**, Pietermaritzburg, v. 76, p. 643–651, 2010.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, 2002.
- CHO, M. et al. The antitumor effects of geraniol: Modulation of cancer hallmark pathways (Review). **International Journal of Oncology**, Atenas, v. 48, p 1772-1782, 2016.
- CHOI, I-H. et al. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Russian Journal of Nematology**, Moscou, v. 15, n. 1, p. 35-40, 2007.
- CNA. PIB do Agronegócio, 2017. Disponível em: <[http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/pib\\_agronegoci\\_o\\_balanco\\_2017.pdf](http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/pib_agronegoci_o_balanco_2017.pdf)>. Acesso em: 27 dez. 2017.
- COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 26, p. 1337-1348, 2007.
- CORBANI, R. Z.; MAZZONETTO, F. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 5, n. 2, p.61-66, 2013.
- CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlim, v. 9, p. 483–488, 2008.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Efeito de extrato aquoso de sementes de abóbora sobre a eclosão e inativação de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 3, p. 3-7, 2009.

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

ECHEVERRIGARAY, S.; ZACARIA, J.; BELTRÃO, R. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leida, v. 100, n. 2, p. 199-203, 2010.

FARIA, J. M. et al. Bioactivity of *Ruta graveolens* and *Satureja montana* essential oils on *Solanum tuberosum* hairy roots and *Solanum tuberosum* hairy roots with *Meloidogyne chitwoodi* co-cultures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.64, n.40, p. 7452-7458, 2016.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: Norma Editora, 2016.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Use of antagonistic plants and natural products. In: CHEN, Z.; CHEN, S-H.; DICKSON, D.W (Ed.). **Nematology advances and perspectives**. V. II – Nematode management and utilization. Beijing, Wallingford, Tsinghua University Press, CAB Publishi, p. 931-977, 2004.

FERREIRA, I. C. M.; SILVA, G. S. da; NASCIMENTO, F. S. Efeito de extratos aquosos de espécies de *Asteraceae* sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n.1, p. 40-44, 2013.

FIALHO, M.B. et al. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.2, p.152-154, 2012.

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**, Sacramento, v. 44, p.321-328, 2012.

INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**, Santa Maria, v.108, p. 4-9, 2008.

ISERI, O. D. et al. Screening of *Nasturtium officinale* extracts for biological activities: implications for plant pathogens. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, London, v. 4, n.1, p. 19-28, 2014.

JARDIM, C. M. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, University Park, v. 34, p. 1213–1218, 2008.

JARDIM, I. N. et al. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal Pest Science**, Innsbruck, v. 91, n. 1, p. 479-487, 2017.

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

- KONG, J-O. et al. Nematicidal and propagation activities of thyme red and white oil compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: *Parasitaphelenchidae*). **Journal of Nematology**, Sacramento, v. 39, n. 3, p. 237–242, 2007.
- KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Eds.). **Biology of floral scent**. p. 27-52, 2006.
- LAZZERI, L. et al. Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Easton, v. 52, p. 6703-6707, 2004.
- LÓPEZ, L. E. et al. Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 42, p. 443–450, 2017a.
- LÓPEZ, L. E. 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**, Brasília, 2017b.
- LORD, J. S. 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 and Chemistry**, Easton, v. 59, p. 7882–7890, 2011.
- MACHADO, A. C. Z. Current nematode threats to Brazilian agriculture. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 20 n. 1, p. 26-35, 2014.
- MARTÍNEZ, R. et al. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, Norwich, v. 135, p. 1520–1526, 2012.
- MARTINS, M da. C. B.; SANTOS, C. D. G. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 135-142, 2016.
- MATTEI, D. et al. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* in the control of *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.2, p. 469-476, 2014.
- MCCARTER, J. P. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematodes. In: Berg, R.H., Taylor, C.G. (Eds.), **Cell Biology of Plant Nematode Parasitic – Plant Cell Monographs**, p. 239–267, 2008.
- MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de Controle da Erva-de-Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 513-516, 2006.
- MELO, M. S. et al. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, Nova York, v. 48, n. 4, p. 411–416, 2010.
- MONTESINOS, E. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters**, New Jersey, v. 270, n. 1, p. 1-11, 2007.
- MOREIRA, J. F. C. et al. Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) raça 2, com óleos essenciais em solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.41, n.3, p. 207-213, 2015.
- MÜLLER, G. C. et al. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitões. **Journal of Vector Ecology**, Moscow, v. 4, n. 1, p. 2-8, 2009.

- NEERAJ, S. R. et al. Effect of plant extracts on hatching and mortality of root-knot nematode, *Meloidogyne Incognita* larvae (*in-vitro*). **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Skudai, v. 14, p. 467-471, 2017.
- NIKAN, J.; KHAVARI, H. *In vitro* anti-fungal activity of watercress (*Nasturtium officinale*) extract against *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot. **Journal of Herbal Drugs**, Shahrekord Branch, v. 5, n. 1, p. 19-24, 2014.
- NTALLI, N. G.; CABONI, P. Botanical nematicides: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 40, p. 9929-9940, 2012.
- NTALLI, N. G. et al. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, New Jersey, v. 67, p. 341–351, 2011.
- OJAGHIAN, M. R. et al. *In vitro* biofumigation of brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology Journal**, Gangnam-gu, v. 28, n. 2, p. 185-190, 2012.
- OKA, Y. Nematicidal activity of fluensulfone against somemigratory nematodes under laboratory conditions. **Pest Management Science**, New Jersey, v. 70, n. 10, p. 1850-1858, 2014.
- OLIVEIRA, L. S. S de.; FERREIRA, F. S.; BARROSO, A. M.; Erva de Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.): Aplicações clínicas e formas tóxicas – Revisão de literatura. **JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, Campos dos Goytacazes, v. 7, n. 13, p. 464 – 499, 2014.
- OMC. World Trade Statistical Review 2017. Disponível em: < [www.wto.org/statistics](http://www.wto.org/statistics)>. Acesso em: 27 dez. 2017.
- PARK, I-K. et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology**, Sacramento, v. 39, n. 3, p.275–279, 2007.
- PASSOS, F. R.; REIS, M. R. Resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: revisão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 23, p. 49-58, 2013.
- PELEGRINI, P. B. *Peptídeos vegetais: novas ferramentas no controle de patógenos humanos e de plantas*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Nova York, v.311, n.5762, p. 808-811, 2006.
- PIMENTA, L. et al. Wood-associated fungi produce volatile organic compounds toxic to root-knot nematode. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.74, n.4, p.303-310, 2017.
- POURHASSAN-MOGHADDAM, M. et al. Watercress-based gold nanoparticles: biosynthesis, mechanism of formation and study of their biocompatibility *in vitro*. **Micro & Nano Letters**, Pequim, v. 9, n. 5, p. 345–350, 2014.

REGNIER, T. et al. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 61, p. 151-159, 2014.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SAIBABU, V. et al. Insights into the intracellular mechanisms of citronellal in *Candida albicans*: implications for reactive oxygen species-mediated necrosis, mitochondrial dysfunction, and DNA damage. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 50, n. 4, p. 524-529, 2017.

SANTOS, B. H. et al. Dietary fibre and antioxidant compounds in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel and depectinised peel waste. **International Journal of Food Science and Technology**, Christchurch, v. 50, p. 268-274, 2015.

SANTOS, P. L. dos. et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 2562, 2013.

SEIXAS, P. T. L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v.13, p.523-526, 2011.

SERRA, B. et al. *In vitro* activity of 2-phenylethyl glucosinolate, and its hydrolysis derivatives on the root-knot nematode *Globodera rostochiensis* (Woll.). **Scientia Horticulturae**, Columbia Britânica, v. 92, n. 1, p. 75-81, 2002.

SHASANY, A. K. et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzzenhausen, v. 47, p. 553–559, 2000.

SILVA, G. S. da. Métodos alternativos de controle de fitonematoides. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, Piracicaba, v. 19, p. 81-152, 2011.

SILVA, J.C.P. *Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de Cymbopogon nardus, Piper nigrum, Brassica oleracea, Helianthus annuus, Bertholletia excelsa, a Meloidogyne incognita*. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SILVA, J.C.P. da. *Compostos orgânicos voláteis de plantas e o etanol no control de Meloidogyne incognita*. 2016. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, J.C.P. da. et al. Toxicity of ethanol solutions and vapours against *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leida, v. 19, n. 3, p. 271 – 280, 2017.

SILVA, J. K. da. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, Ontario, v. 53, n. 2, p. 882-890, 2013.

SILVA, M de J. M da S. et al. Atividade antifúngica de óleos de sementes de frutas frente aos fungos *Cladosporium* e *Colletotrichum*. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS – MICROAL, 12, 2014. Foz do Iguaçu. **Anais...**São Paulo: Blucher, 2014.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TERRA, W. C. et al. Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, College Station, v. 112, p. 34–40, 2017.
- TERRA, W. C. et al. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, Lincoln, v. 106, p. 125–131, 2018.
- TORRES, M. C. M. et al. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 5, p. 2724-2728, 2008.
- TSAO, R.; Yu, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, v. 12, n. 3, p. 350-354, 2000.
- VARGAS, J. H. L. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, Ontario, v. 51, p. 756–763, 2013.
- WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iranian Journal of Microbiology**, Teerã, v. 5, n. 2, p. 147-152, 2013.
- XAVIER, K.V. *Extratos de casca de maracujá e de laranja na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem e em tomateiro contra a mancha bacteriana*. 2011. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- XU, Y-Y. et al. Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 12, p. 1415-1421, 2015.
- YANG, X. et al. The nematicidal effect of camellia seed cake on root-knot nematode *Meloidogyne javanica* of banana. **Journal.pone.**, São Francisco, 2015
- ZAHRADNÍKOVÁ, H.; PETŘÍKOVÁ, K. Nematocid effects of watercress (*Nasturtium officinale* R. BR). **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, Brno, v. 61, n. 1, p. 233-236, 2013.
- ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Nematology**, Leida, v. 93, n. 6, p. 747-750, 2003.
- ZUCOLOTTI, S. M. et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, Nova York, v. 75, p. 1221–1226, 2009.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

#### **Compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita***

Marcela de Freitas Silva<sup>a</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>a,\*</sup>, Aline Ferreira Barros<sup>a</sup>, Márcio Pozzobon Pedroso<sup>b</sup>, Júlio Carlos Pereira da Silva<sup>a</sup>, Fabíola de Jesus Silva<sup>a</sup>, Júlio César Justino<sup>a</sup>

#### RESUMO

Compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a fitonematoides são encontrados em algumas plantas. Porém, ainda são desconhecidos os efeitos de emissões gasosas das dezoito plantas estudadas neste trabalho a J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*. Portanto, foi realizado um *screening* com as plantas, para selecionar aquelas com maior toxicidade a *M. incognita*, para estudos posteriores. Para isso, utilizou-se um método que permitiu o contato apenas pelo ar, dos COVs dos macerados das espécies aqui estudadas com os J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Quinze espécies de plantas emitiram COVs com efeito nematostático aos J<sub>2</sub>. Porém, somente os COVs emitidos por *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* apresentaram efeito nematicida. O aumento das quantidades dos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides* emitiram COVs que causaram alta imobilidade dos J<sub>2</sub> e, apenas para *C. nardus*, alta mortalidade. As águas expostas aos COVs produzidos pelas duas espécies foi tóxica aos J<sub>2</sub>, causando sua imobilidade. Após a exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs emitidos por *C. nardus* e *D. ambrosioides* e inoculação em tomateiros, ocorreram reduções no número de galhas e ovos. Também houve redução na infectividade e

---

<sup>a</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, CP3037, Lavras, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, CP3037, Lavras, Minas Gerais, Brazil

\* Autor correspondente: Vicente Paulo Campos ([vpcampos@dfp.ufla.br](mailto:vpcampos@dfp.ufla.br)). Phone: (55) (35) 3829-1469

reprodução em tomateiros, através do processo de biofumigação, utilizando-se a mistura dos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides* com substrato e ovos de *M. incognita*. Foram identificados por GC-MS, 45 e 26 compostos emitidos por *C. nardus* e *D. ambrosioides*, respectivamente. *C. nardus* e *D. ambrosioides* emitem COVs tóxicos a *M. incognita* diretamente ou através da biofumigação, os quais podem ser dissolvidos na água e atuarem por mais tempo nos fitonematoides.

**Palavras-chave:** Nematóide das galhas. *Cymbopogon nardus*. *Dysphania ambrosioides*. Biofumigação.

**Volatile organic compounds emitted by medicinal plants in the control of *Meloidogyne incognita***

**ABSTRACT**

Volatile organic compounds (VOCs) toxic to phytonematodes are found in some plants. However, the effects of gaseous emissions from the eighteen plants studied in this work are still unknown to J<sub>2</sub> of *Meloidogyne incognita*. Therefore, a screening with the plants was carried out to select those with higher toxicity to *M. incognita* for further studies. To do this, the method used only allowed air contact between, the VOCs of the macerates of the species studied here and the J<sub>2</sub> of *M. incognita*. Fifteen species of plants emitted VOCs with a nematode effect to J<sub>2</sub>. However, only VOCs emitted by *Cymbopogon nardus* and *Dysphania ambrosioides* showed nematicidal effect. Increased amounts of macerated *C. nardus* and *D. ambrosioides* emitted VOCs that caused high immobility of J<sub>2</sub> and, for *C. nardus* only, high mortality. The waters exposed to VOCs produced by both species were toxic to J<sub>2</sub>, causing their immobility. After exposure of the J<sub>2</sub> to VOCs emitted by *C. nardus* and *D. ambrosioides* and inoculation in tomato plants, there were reductions in the number of galls and eggs. Moreover, there was a reduction in infectivity and

reproduction in tomatoes, through the biofumigation process, using the macerated mixture of *C. nardus* and *D. ambrosioides* with substrate and eggs of *M. incognita*. GC-MS procedure identified, 45 and 26 compounds emitted by *C. nardus* and *D. ambrosioides*, respectively. *C. nardus* and *D. ambrosioides* emit VOCs toxic to *M. incognita* either directly or through biofumigation, which can be dissolved in water and act longer on phytonematodes.

**Keywords:** Root-knot nematode. *Cymbopogon nardus*. *Dysphania ambrosioides*. Biofumigation.

## 1. INTRODUÇÃO

Fitonematoides são parasitas de plantas capazes de causarem prejuízos de US\$ 157 bilhões para agricultura mundial, chegando a 14,6% de perdas na produção agrícola em regiões tropicais e subtropicais (ABAD et al., 2008; NICOL et al., 2011). Os principais gêneros de nematoides relacionados a essas perdas agrícolas são *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Pratylenchus*, sendo *Meloidogyne* spp. considerados os fitonematoides de maior importância econômica mundial (MACHADO, 2014).

O controle químico é o principal método empregado no manejo de fitonematoides. No entanto, a maioria dos nematicidas comerciais degrada o meio ambiente e apresenta efeitos tóxicos a humanos e animais (SOUSA et al., 2014). Moléculas nematicidas menos tóxicas ao ambiente e a saúde humana continuam sendo buscadas para integrar estratégias de manejo mais sustentáveis, como rotação de culturas com plantas não hospedeiras ou antagônicas (MORAES, et al., 2006; INOMOTO, 2008; OSEI et al., 2011; SANTANA et al., 2012).

O uso de plantas antagônicas no controle de nematoides pode ser realizada através da biofumigação. Neste processo, os tecidos vegetais são triturados e incorporados no solo,

que recebe uma cobertura plástica, ocorrendo a liberação de substâncias voláteis e não voláteis, que podem atuar sinergicamente ou não. Por este processo, as substâncias voláteis não são perdidas para a atmosfera, podendo aumentar a eficiência de controle (NEVES et al., 2007). Algumas moléculas voláteis apresentam ação nematicida, como os isotiocianatos, produzidos por brássicas e sementes de mamão, entre outras moléculas (KERMANSHAI et al., 2001; BONES e ROSSITER, 2006; OJAGHIAN et al., 2012).

Na biofumigação é relevante a ação da microbiota, sendo que a sua associação com os resíduos vegetais torna as emissões voláteis 11 vezes mais tóxicas a fitonematoides, comparado com os resíduos esterilizados (GRAY et al., 2010). Recentemente, foi desenvolvida uma técnica que permite testar o efeito isolado dos COVs emitidos na biofumigação, possibilitando o aprisionamento deles na superfície da mistura de solo e substrato com a fonte emissora, sendo feita a introdução do fitonematoide somente quando a câmara de gás já estiver formada (BARROS et al., 2014a; LÓPZES et al., 2017a). Compreender o processo de biofumigação, ajuda a melhorar sua eficiência como método de controle (LORD et al., 2011). Outro aspecto da rizosfera é o papel da água do solo como veículo de movimentação de moléculas no processo de biofumigação. Alguns COVs ficam retidos na água devido a sua dissolução, prolongando o seu efeito e evitando perdas para a atmosfera (MARTINS et al., 2013; SILVA et al., 2017; TERRA et al., 2017).

Desta forma, o efeito tóxico dos COVs emitidos por espécies vegetais isoladamente ou em mistura pode ser promissor na busca de futuros nematicidas para o mercado. Pesquisas têm revelado o efeito isolado de compostos voláteis emitidos por microrganismos, tecidos vegetais e vapores de etanol no controle de fitonematoides tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*” (FREIRE et al., 2012; BARROS et al., 2014b; LÓPEZ et al., 2017a, 2017b; SILVA et al., 2017).

As espécies vegetais *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* são conhecidas como plantas medicinais com os nomes populares, respectivamente, citronela e erva-de-santa-maria. Algumas de suas atividades nematicidas são conhecidas através do uso de óleos essenciais e extratos aquosos (ECHEVERRIGARAY et al., 2010; BAI et al., 2011; ANDRÉS et al., 2012; CORBANI e MAZZONETTO, 2013; MARTINS e SANTOS, 2016.). No entanto, ainda são desconhecidos os efeitos dos COVs emitidos por macerados de folhas frescas de *C. nardus* e *D. ambrosioides*, bem como, a atuação deles no processo de biofumigação e na dissolução em água por exposição. O conhecimento desses compostos pode, no futuro, levar a síntese de moléculas para substituir nematicidas altamente tóxicos no mercado, além de atender os sistemas agroecológicos.

Portanto, neste trabalho, foi realizado um *screening* com diversas espécies de plantas, a fim de selecionar aquelas com emissões voláteis mais tóxicas a *M. incognita* e posteriormente estudar a retenção dos seus COVs pela água e o efeito dos COVs na biofumigação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção do inóculo de *M. incognita***

Populações puras de *M. incognita* foram multiplicadas em plantas de tomate cultivar Santa Clara<sup>®</sup> durante 60 dias em casa-de-vegetação. Ao final, ovos do nematoide foram extraídos de raízes com galhas conforme técnica de Hussey e Barker (1973) e colocados em câmara de eclosão a 28°C. Os J<sub>2</sub> eclodidos nas primeiras 24 h foram descartados e, aqueles eclodidos em 48 h foram utilizados nos ensaios.

### **2.2. Coleta de material vegetal e preparo de macerados**

Folhas de transagem (*Plantago major*), físalis (*Physalis* sp.), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), losna (*Artemisia absinthium*), arruda (*Ruta graveolens*), tomilho (*Thymus*

*vulgaris*), manjeriço-de-folha-larga (*Ocimum basilicum*), coentro (*Coriandrum sativum*), citronela (*Cymbopogon nardus*), pitanga (*Eugenia uniflora*), melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*), guiné (*Petiveria alliacea*), beldroega (*Portulaca oleracea*), caruru (*Amaranthus viridis*), erva de santa maria (*Dysphania ambrosioides*), cajueiro (*Anacardium occidentale*) e hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) foram coletadas aproximadamente às 7 h da manhã em Lavras, MG, Brasil. Amostras de folhas de cada espécie vegetal foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto, seguido de três lavagens em água destilada e utilizadas para o preparo do macerado fresco. O excesso de água foi eliminado com papel toalha e o material vegetal foi colocado em almofariz, macerado com pistilo sem adição de água. O material macerado foi imediatamente utilizado na condução dos ensaios.

### **2.3. Screening de plantas medicinais que emitem COVs tóxicos a J<sub>2</sub> de *M. incognita***

O macerado vegetal (1,5 g) foi colocado na superfície de areia autoclavada (35 g) contida em frascos Supelco™ (80 cm x 28 mm, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) esterilizados, seguido da adição de água destilada (2 mL), conforme Barros et al. (2014b). Como controle, frascos sem material vegetal receberam 2 mL de água sobre a areia. Um microtubo (1,5 mL) esterilizado e sem tampa foi imerso até a sua metade na areia de cada frasco. Os frascos foram imediatamente vedados com uma tampa rosqueada e mantidos a 25°C por 72 h para a emissão e acúmulo dos COVs. Ao final, uma suspensão (1 mL) com cerca de 200 J<sub>2</sub> de *M. incognita* foi injetada dentro do microtubo, por meio de uma seringa, perfurando a película de silicone vedadora da tampa rosqueada e, armazenado, novamente, por 24 h para a exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs. Ao final, os frascos Supelco™ foram abertos e de cada microtubo foram retirados 100 µL da suspensão de J<sub>2</sub> e

transferidos para poço na placa de polipropileno, sendo quantificada a percentagem de J<sub>2</sub> móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida (Nikon TMS-F N<sup>o</sup>. 211213). A mortalidade dos J<sub>2</sub> foi avaliada 24 h após a contagem da imobilidade. Os J<sub>2</sub> ainda imóveis foram considerados mortos. Os macerados vegetais que apresentaram as maiores toxicidades a *M. incognita* foram selecionados para utilização nos demais ensaios.

#### **2.4. Quantidade (g) de macerado vegetal suficiente para emitir COVs tóxicos a *M. incognita***

Macerados das duas plantas com melhores resultados no ensaio anterior (*C. nardus* e *D. ambrosioides*) foram utilizados em diversas quantidades (g) a fim de avaliar a influência da massa da amostra sobre a toxicidade a *M. incognita*. Para isso, foram utilizadas seis quantidades (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g) do macerado de cada espécie vegetal, sendo a quantidade (zero grama) referente ao controle, conforme a metodologia de Barros et al. (2014b) descrita anteriormente.

#### **2.5. Toxicidade da água a J<sub>2</sub> de *M. incognita* após exposição aos COVs de *C. nardus* e *D. ambrosioides***

Na superfície de areia autoclavada (35 g) contida em frascos Supelco™ esterilizados, foram depositados água destilada (2 mL) seguido de macerado vegetal das plantas (1,5 g). Dentro de cada frasco, antes da vedação, também foi colocado um microtubo (2 mL) sem tampa contendo 1 mL de água. Em seguida, os tubos foram vedados e mantidos a 25°C durante 72 h. Como controle positivo foi utilizado 1,5 g do macerado da inflorescência de brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), que tem apresentado toxicidade a *M. incognita* (Silva et al., 2018). Já para o controle negativo, foi utilizado frasco contendo somente areia e microtubo com 1 mL de água. Após 72 h, os microtubos com água foram retirados de dentro dos frascos e, em cada um deles, foi injetada uma suspensão (0,5 mL)

contendo cerca de 200 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Os microtubos com a suspensão de J<sub>2</sub> e água foram fechados com tampa e mantidos a 25°C por 48 h. Ao final, os microtubos foram abertos e deles foram retirados 100 µL da suspensão de J<sub>2</sub> que foram transferidos para poço na placa de polipropileno para quantificação da porcentagem de imobilidade e após 24 h, a mortalidade dos J<sub>2</sub>.

## **2.6. Infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiros após exposição de J<sub>2</sub> aos COVs de macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides***

Emissões de COVs de *C. nardus* e *D. ambrosioides* foram obtidas de 0,5 e 2,0 g de macerados conforme já descrito anteriormente empregando-se frasco Supelco™, porém com injeção no microtubo de cada frasco de uma suspensão (1 mL) contendo 600 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Como controle, foram utilizados frascos sem material vegetal. Vinte quatro horas após a exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs de cada macerado, aproximadamente 30 µL (20 J<sub>2</sub>), foram transferidos para placa de polipropileno para a quantificação dos J<sub>2</sub> móveis e imóveis visando a confirmação da imobilidade observada nos testes anteriores. A suspensão restante (cerca de 580 J<sub>2</sub>) foi dispersa em 3 mL de água destilada e, então, inoculada em plantas de tomate cultivar Santa Clara®, aos 20 dias após a semeadura em bandejas de isopor com 72 células de 75 cm<sup>3</sup> preenchidas com substrato comercial (Tropstrato®, Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda., Mogi Mirim - SP, Brasil). O inóculo foi depositado em volta do caule da planta através de 3 orifícios equidistantes (0,4 cm de largura x 1,5 cm de profundidade). As mudas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação diária e receberam adubação foliar (Biofert Plus Universal®, Biofert, Contagem - MG, Brasil) sempre que necessário. Após 45 dias da inoculação, as raízes foram, cuidadosamente, removidas, lavadas em água parada, secas em toalhas de papel e pesadas. Após a contagem das galhas, os ovos foram extraídos

das raízes pela técnica de Hussey e Barker (1973) e quantificados em microscópio de objetiva invertida em câmara de Peters.

### **2.7. Biofumigação de substrato misturado com macerado vegetal mais ovos de *M. incognita* e toxicidade dos voláteis liberados**

Copos de poliestireno (300 mL) foram preenchidos com substrato comercial (100 g) Tropstrato<sup>®</sup>. Em seguida, macerados de *C. nardus* ou *D. ambrosioides* nas quantidades de 0; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g, foram incorporados ao substrato. A quantidade zero grama refere-se ao controle. Uma suspensão aquosa (2,5 mL) contendo 3.000 ovos de *M. incognita* foi aplicada em saco plástico juntamente com o substrato mais o macerado das plantas para homogeneização. Logo após, a mistura (substrato + macerado vegetal + ovos) foi colocada nos copos plásticos, ajustando-se a umidade para 60% da capacidade de campo. Para estudar isoladamente o efeito dos COVs sem interferência das moléculas não voláteis, foi colocado um microtubo (1,5 mL) aterrado até sua metade na mistura. O copo com a mistura foi vedado com uma tampa de poliestireno formando uma câmara de gases liberados pela mistura de macerado fresco + substrato. Setenta e duas horas após a vedação, foi injetado, com uma seringa, uma suspensão (1 mL) contendo 200 J<sub>2</sub> de *M. incognita* no interior do microtubo. O furo provocado na tampa pela perfuração da seringa foi vedado com fita adesiva, conforme metodologia de Barros et al. (2014a) e López et al. (2017a). Após 48 h de exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs, o copo foi aberto e 100 µL da suspensão de J<sub>2</sub> de cada microtubo foi transferida para placa de polipropileno sendo avaliada a imobilidade e após 24 h, a mortalidade dos J<sub>2</sub>. Após a remoção das tampas dos copos e dos microtubos, uma plântula de tomate contendo quatro pares de folhas foi transplantada para cada copo contendo a mistura (substrato + macerados + ovos de *M. incognita*). Quarenta e cinco dias após foi avaliado o número de galhas e de ovos por sistema radicular.

## 2.8. Identificação dos COVs emitidos pelos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides*

Através da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), foram analisadas as emissões gasosas de amostras (1,5 g) em cinco replicatas dos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides*. As amostras foram colocadas em frascos de SPME (20 mL) incubadas a 25°C. Foram analisados os voláteis emitidos durante 72 h após o fechamento dos tubos. Para a extração dos COVs foi empregada a SPME (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990) no modo *headspace*, usando a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano), com temperatura (55°C), agitação (250 rpm) e tempo de extração (35 minutos) determinados. Para a separação e identificação dos COVs o cromatógrafo a gás foi acoplado a um 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, 2017) 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 for maior que 80%.

### **2.9. Atividade nematicida de COVs encontrados nas emissões gasosas de *C. nardus* e *D. ambrosioides***

Para este ensaio, foram selecionadas três moléculas identificadas isoladamente nas emissões dos macerados vegetais de *C. nardus* ou *D. ambrosioides*, com toxicidade desconhecida a *M. incognita*, disponíveis no mercado e de custo acessível. As moléculas utilizadas foram Isopulegol, Dodecano e  $\alpha$ -Ionona, adquiridas pela empresa Sigma-Aldrich, Saint Louis – MO, USA. A atividade nematicida foi avaliada usando suspensão aquosa (0,5 mL) contendo 200 J<sub>2</sub> misturados às moléculas dissolvidas em Tween 80 a 0,01 g/mL (0,5 mL) em um microtubo (1,5 mL). As concentrações finais das moléculas dentro de cada microtubo foram de 1000  $\mu$ g/mL e 500  $\mu$ g/mL. O Tween 80<sup>®</sup> a 0,01 g/mL foi utilizado como controle. Os microtubos foram fechados e mantidos a 25°C por 48h. Ao final, uma alíquota (100  $\mu$ L) foi transferida para placa de polipropileno, e quantificados os J<sub>2</sub> moveis e imóveis. Para avaliar a mortalidade dos J<sub>2</sub>, foram adicionadas duas gotas da solução recém preparada de NaOH 1,0 mol/L em cada cavidade da placa com os J<sub>2</sub>. Aqueles que reagiram ao NaOH, movimentando o seu corpo num intervalo de 3 minutos foram considerados vivos, caso contrário, foram considerados mortos (CHEN e DICKSON, 2000 adaptado por AMARAL et al., 2003).

### **2.10. Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizados, com cinco repetições por tratamento. Os resultados foram, previamente, submetidos a testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância dos erros (Bartlett).

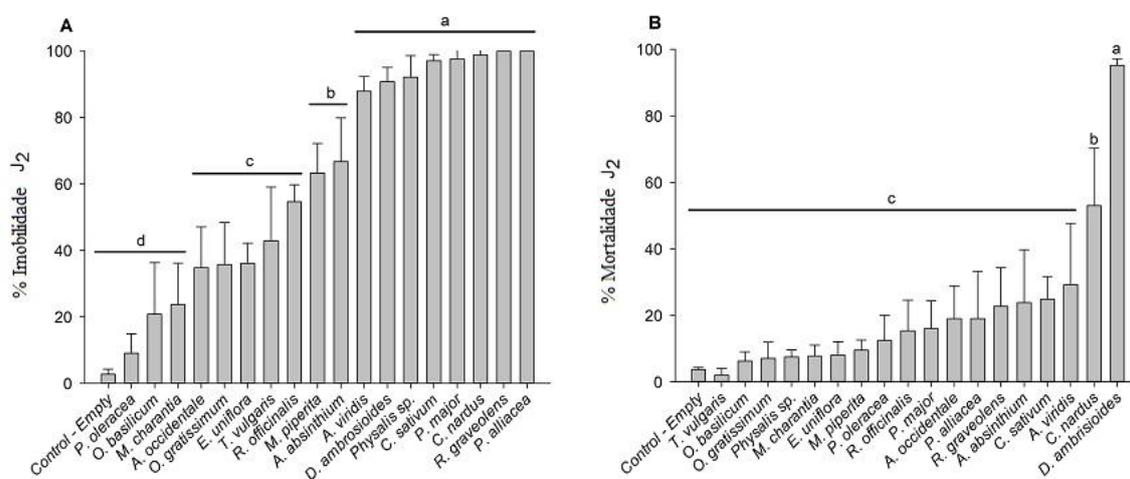
Uma vez atendidos os pressupostos, foi aplicado o teste F, por meio da análise de variância (ANOVA). Para o teste de *screening* de plantas através da produção de COVs tóxicos a J<sub>2</sub>, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 0.05 de significância. Já as médias dos outros ensaios foram comparadas pelo teste de Tukey a 0.05 de significância. Os tratamentos do ensaio de reprodução e infectividade com J<sub>2</sub> expostos aos COVs das plantas, foram organizados em esquema fatorial com 2 espécies vegetais (*C. nardus* e *D. ambrosioides*) x 3 quantidades (0,0; 0,5 e 2,0 g). O ensaio de atividade nematicida dos COVs também constou de esquema fatorial com 3 moléculas (Isopulegol, Dodecano e  $\alpha$ -Ionona) x 3 concentrações (0, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Nos ensaios sobre a quantidade dos macerados vegetais e biofumigação no copo juntamente com os voláteis liberados ao ar, os tratamentos foram organizados em esquemas fatoriais com 2 espécies vegetais (*C. nardus* e *D. ambrosioides*) x 6 quantidades (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g) e 2 espécies vegetais (*C. nardus* e *D. ambrosioides*) x 5 quantidades (0,0; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g), respectivamente. Na análise de variância foi realizada análise de regressão, escolhendo o melhor modelo para a curva. Os programas SigmaPlot<sup>®</sup> versão 12 e Sisvar<sup>®</sup> foram utilizados para montagem dos gráficos e análises estatísticas, respectivamente.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. *Screening* de plantas medicinais que emitem COVs tóxicos a J<sub>2</sub> de *M. incognita*

Houve diferença significativa entre os tratamentos tanto em relação a imobilidade quanto em relação a mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* ( $p < 0.05$ ). Das 18 espécies de plantas testadas, 15 produziram COVs que causaram imobilidade (35-100%), significativamente, maior que o controle. Além disso, os macerados das espécies *A. viridis*, *D. ambrosioides*, *Physalis* sp., *C. sativum*, *P. major*, *C. nardus*, *R. graveolens* e

*P. alliacea* emitiram COVs com maior efeito tóxico dentre todos testados, causando 88-100% de imobilidade dos J<sub>2</sub> (Fig. 1.A). Em relação a mortalidade, somente os macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides* que se diferenciaram do controle, causaram 53% e 95% de mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita*, respectivamente (Fig. 1.B). Desta forma, as emissões dos macerados foliares de *C. nardus* e *D. ambrosioides* causaram altas imobilidades e mortalidades de J<sub>2</sub> de *M. incognita*.



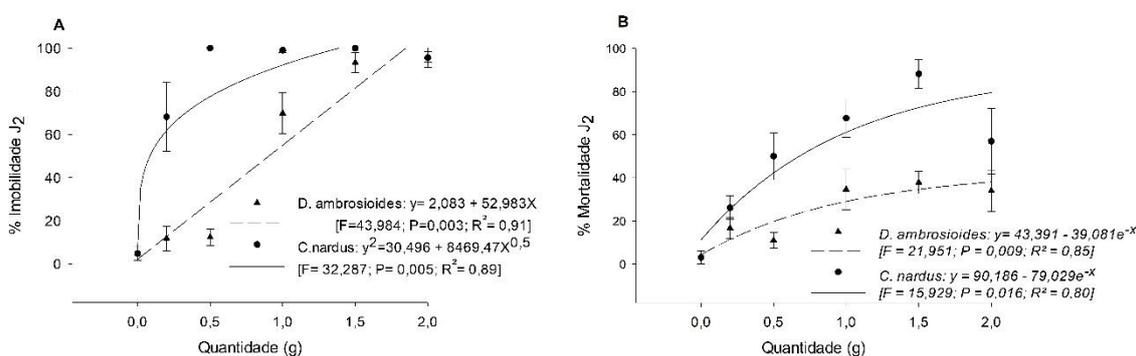
**Fig. 1.** Porcentagem de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* imóveis (A) e mortos (B) devido a exposição aos compostos orgânicos voláteis emitidos pelos macerados (1,5 gramas) das folhas das espécies de plantas. Letras diferentes entre os tratamentos indicam que houve diferença significativa pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média.

### 3.2. Quantidade (g) de macerado vegetal suficiente para emitir COVs tóxicos a *M. incognita*

Houve interação significativa entre as espécies de plantas e as quantidades de macerados quando se avaliou imobilidade e mortalidade. Os macerados de *C. nardus* sempre causaram maior imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> comparados ao de *D. ambrosioides*. Também, a porcentagem de imobilidade foi sempre maior do que a de mortalidade, indiferente da planta testada. Para *C. nardus*, a menor quantidade de macerado (0,2 g) emitiu COVs que imobilizou 68% dos J<sub>2</sub>. A partir da quantidade de 0,5 g, houve imobilização acima de 95%. Entretanto, os COVs emitidos por *D. ambrosioides*

causaram imobilidade acima de 90% somente a partir da quantidade de 1,5 g do macerado (Fig. 2.A).

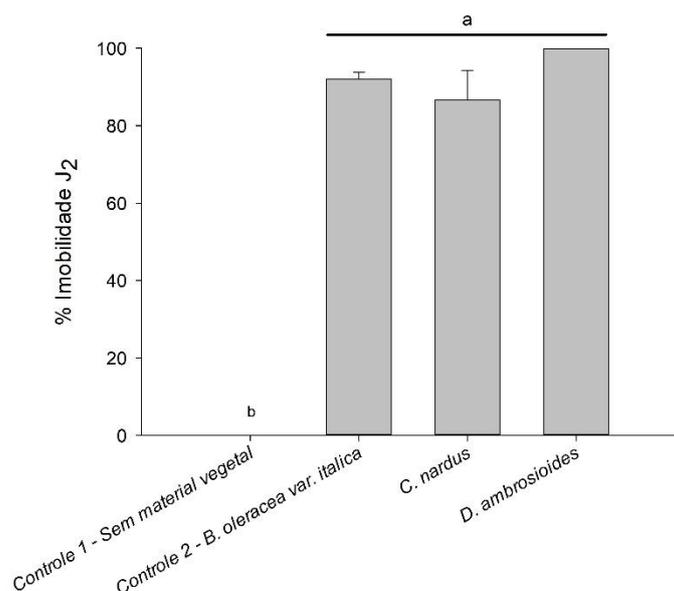
A mortalidade aumentou de forma exponencial em relação ao aumento da quantidade de macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides*. No entanto, a mortalidade máxima causada pelos COVs emitidos pelos macerados de *D. ambrosioides* foi de 37,8%. Já para *C. nardus*, a porcentagem de mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* chegou a 88,2% (Fig. 2.B).



**Fig. 2.** Porcentagem de imobilidade (A) e mortalidade (B) de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* expostos a compostos orgânicos voláteis emitidos por macerados de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* em diferentes quantidades. As barras indicam o erro padrão da média.

### 3.3. Toxicidade da água a J<sub>2</sub> de *M. incognita* após exposição aos COVs de *C. nardus* e *D. ambrosioides*

A água exposta aos COVs emitidos tanto pelos macerados de *C. nardus* quanto pelos macerados de *D. ambrosioides* causou imobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* semelhante ao controle positivo (emissões de *B. oleracea* var. *italica*) ( $p < 0,05$ ). No entanto, a imobilidade causada pelas emissões do macerado de *D. ambrosioides* foi de 100%, enquanto que as emissões do controle positivo e de *C. nardus* causaram imobilidade de 92% e 86,6%, dos J<sub>2</sub> de *M. incognita*, respectivamente (Fig. 3). Os COVs retidos em água emitidos pelos macerados das plantas estudadas não causaram mortalidade significativa ( $p > 0,05$ ), incluindo o controle positivo.



**Fig. 3.** Toxicidade adquirida pela água exposta a compostos orgânicos voláteis de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* baseado na porcentagem de imobilidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* em relação aos controles: (1) frasco sem macerado vegetal e (2) inflorescência de *Brassica oleracea* var. *italica*. Letras diferentes entre os tratamentos indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média.

### 3.4. Infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiros após exposição de J<sub>2</sub> aos COVs de macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides*

A elevada imobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* expostos aos COVs emitidos pelos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides* antes da inoculação em tomateiros foi confirmada neste ensaio. As quantidades de macerados (0,5 e 2,0 g) utilizados das duas plantas diminuíram significativamente o número de galhas e ovos em plantas de tomate que foram inoculadas com J<sub>2</sub> de *M. incognita* expostos aos COVs de *C. nardus* e *D. ambrosioides* ( $p < 0,05$ ).

Houve interação significativa entre as quantidades de macerados e as espécies vegetais, sendo que *D. ambrosioides*, reduziu 68% do número de galhas em comparação ao controle, sendo também maior que a redução causada por *C. nardus*. Os macerados de *C. nardus* causaram redução de aproximadamente 47% no número de galhas comparados

ao controle, porém não houve diferença significativa entre as quantidades 0,5 e 2,0 g ( $p > 0.05$ ) (Tabela 1).

Não houve interação significativa entre as quantidades de macerados e espécies de plantas em relação a quantidade de ovos ( $p > 0.05$ ). Porém, o número de ovos foi reduzido nas duas quantidades de macerados (0,5 e 2,0 g) utilizadas, tanto para *C. nardus* (41 – 74%) quanto para *D. ambrosioides* (49 – 94,5%), ( $p < 0.05$ ). (Tabela 1).

### Tabela 1

Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro inoculadas com juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita* após a exposição a compostos orgânicos voláteis emitidos por duas quantidades (0,5 e 2,0 g) de macerados de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides*.

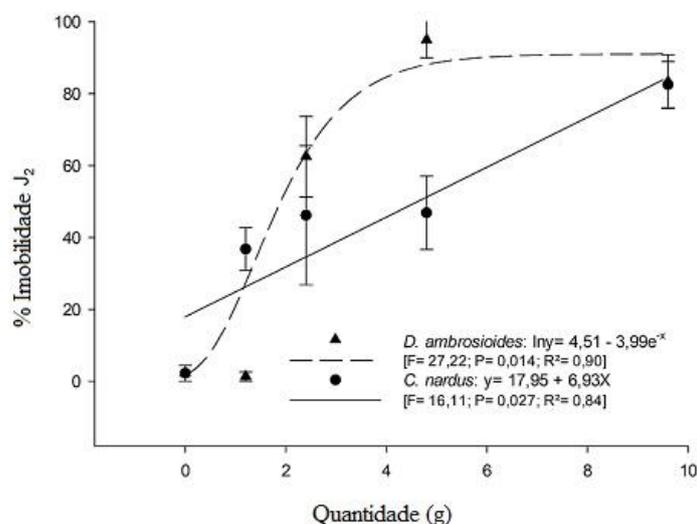
Macerado vegetal (g)	Galhas.g <sup>-1</sup> de raiz		Ovos.g <sup>-1</sup> de raiz	
	<i>C. nardus</i>	<i>D. ambrosioides</i>	<i>C. nardus</i>	<i>D. ambrosioides</i>
0,0	19 bA	19 cA	1820 Ba	1820 cA
0,5	12 aA	15 bA	1076 abA	931 bA
2,0	10 aB	6 aA	475 aA	101 aA

Letras maiúsculas diferentes na linha e letras minúsculas diferentes na coluna indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. Biofumigação de substrato misturado com macerado vegetal mais ovos de *M. incognita* e toxicidade dos voláteis liberados

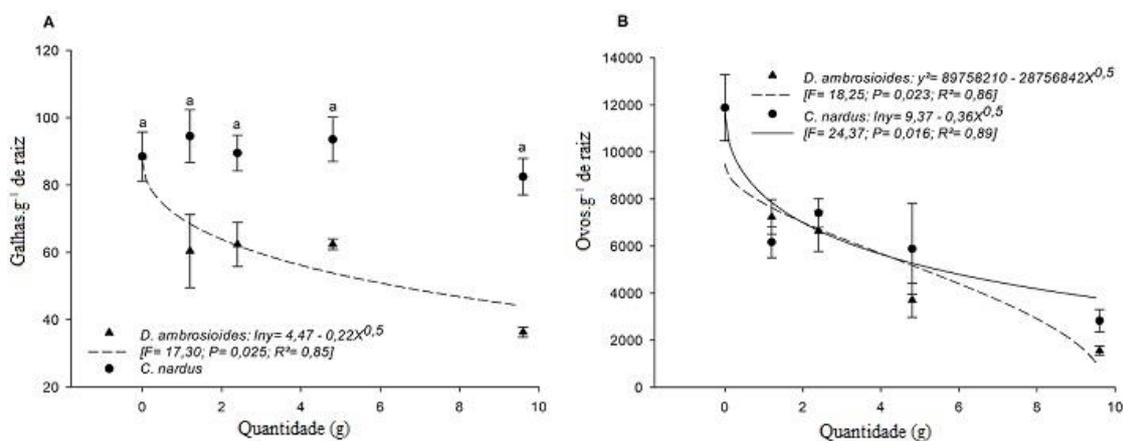
Os COVs emitidos pela mistura composta de macerado de *C. nardus* ou *D. ambrosioides* com substrato e retidos na sua superfície causaram imobilização significativa dos  $J_2$  de *M. incognita* comparados ao controle (quantidade zero) quando a eles expostos. A imobilização dos  $J_2$  foi progressiva com o aumento da quantidade de macerado. No entanto, a porcentagem de imobilidade causada por *D. ambrosioides* foi de 95% a partir da quantidade de 4,8 g, enquanto que *C. nardus* causou imobilidade de 82,5%

somente com 9,6 g de macerado (Fig. 4). Os COVs emitidos pelos macerados das duas plantas não causaram mortalidade significativa dos J<sub>2</sub>.



**Fig. 4.** Porcentagem de imobilidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* expostos a compostos orgânicos voláteis emitidos por diferentes quantidades de macerados de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* incorporados ao substrato em copos fechados, simulando o processo de biofumigação. As barras indicam o erro padrão da média.

Os macerados de *C. nardus* misturados aos substratos contendo ovos de *M. incognita* não reduziram o número de galhas em comparação com o controle ( $p > 0,05$ ). Entretanto, todas as quantidades de macerados de *D. ambrosioides* reduziram significativamente o número de galhas em relação ao controle, alcançando redução entre 32-59% (Fig. 5. A). Todas as quantidades de macerados das duas espécies de plantas misturados ao substrato contendo ovos de *M. incognita*, causaram redução significativa e progressiva no número de ovos com o aumento da quantidade, comparadas ao controle. No entanto, a redução acima de 50% só foi atingida quando foram utilizadas quantidades a partir de 4,8 g, chegando acima de 85% de redução com a aplicação de 9,6 g dos macerados vegetais (Fig. 5. B).



**Fig. 5.** Número de galhas (A) e ovos (B) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro, resultantes da exposição de ovos de *M. incognita* no solo às diferentes quantidades de macerados de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* incorporados ao substrato em copos fechados, simulando o processo de biofumigação. As barras indicam o erro padrão da média.

### 3.6. Identificação dos COVs emitidos pelos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides*

As análises por GC-MS dos voláteis emitidos pelos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides* revelaram 45 e 26 compostos, respectivamente. Onze das 63 moléculas detectadas no total, não foram identificadas. Os compostos identificados nos macerados foram categorizados como baixa (“x”), mediana (“xx”) e alta (“xxx”), em relação a intensidade de picos detectadas nas amostras. Os compostos identificados e com intensidades medianas e altas foram: Cymene / Cymol, Limoneno, Citronellal, Citronellol, (Z) – ascaridol, Geraniol / Nerol, (E) – ascaridol, Cytronellil acetato, β – elemeno e Germacrene D, porém não ocorreram coincidentemente em ambas espécies, com excessão de Cymene / Cymol, Limoneno e Citronellal que ocorreram em ambas. Nas emissões de *D. ambrosioides* o ascaridol Z e E foram os mais intensos enquanto em *C. nardus* foi o Citronellal. Os compostos Dodecano, Isopulegol e α – Ionone ocorreram em emissões de *C. nardus* ou *D. ambrosioides*, porém estiveram sempre em intensidades menores (Tabela 2).

#### Tabela 2

Compostos orgânicos voláteis identificados nos macerados de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* através da cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas.

	Composto	RI Exp. <sup>a</sup>	RI Lit. <sup>b</sup>	Similar. (%) <sup>c</sup>	<i>C. nardus</i>	<i>D. ambrosioides</i>
1	Acetone	600	477	86,5	x	x
2	2-Methylpropanal	608	611	93,0	x	-
3	3-Methylfuran	611	611	93,7	-	x
4	3-Methylbutan-1-al	655	654	90,1	x	x
5	2-Methyl-1-butanal	670	664	91,1	x	x
6	2-Ethylfuran	705	702	95,7	x	x
7	3-Methyl-1-butanol	735	734	89,3	-	x
8	2-Methylpentan-3-one	749	748	91	-	x
9	Hexanal	804	784	93,6	-	x
10	3-Hexen-2-one	840	843	93,9	-	x
11	2-Hexenal	855	854	95,1	x	x
12	2-Hexenol	870	862	86,2	-	x
13	1-Hexanol	871	867	91,7	-	x
14	Benzaldehyde	965	961	96,2	-	x
15	Myrcene	989	988	91,3	x	-
16	Octanal	1007	998	93	x	-
17	$\alpha$ -Phellandrene	1009	1002	87,7	x	-
18	$\alpha$ -Terpinene	1017	1012	91,4	-	x
19	Cymene/Cymol	1024	1022	95,1	x	xx
20	Limonene	1029	1024	95,3	xx	x
21	2,6-Dimethyl-5-heptenal	1055	1055	90,8	x	-
22	$\gamma$ terpinene	1060	1054	90,1	x	-
23	p-Mentha-3,8-diene	1073	1068	90	x	-
24	Terpinolene	1087	1086	93,7	x	-
25	Linalol	1103	1095	91,8	x	-
26	p-Cresol acetate	1127	-	88,6	-	x
27	Isopulegol	1151	1145	95,5	x	-
28	Citronellal	1153	1148	92,7	xxx	x
29	Z4-Decenal	1197	1193	94,2	x	-
30	Dodecano	1200	-	-	x	-
31	Unidentified	1202	-	-	x	-
32	Unidentified	1203	-	-	x	-
33	Unidentified	1204	-	-	x	-
34	Unidentified	1205	-	-	x	-
35	Decanal	1208	1209	92,9	x	-

36	Unidentified	1210	-	-	-	x
37	Citronellol	1231	1228	95,3	xx	-
38	Neral	1244	1244	81,7	x	-
39	(z)ascaridol	1246	1237	1234	-	xxx
40	Unidentified	1249	-	-	-	xxx
41	(Geraniol/Nerol)	1256	1255	91,8	xx	-
42	Unidentified	1274	-	-	-	xx
43	Geranial	1274	1264	84,5	x	-
44	Unidentified	1285	-	-	-	xx
45	Geranyl formate	1305	1298	94,2	x	-
46	(E) Ascaridol	1311	1301	1305	-	xxx
47	Citronellyl acetate	1352	1350	92,9	xx	-
48	Eugenol	1359	1356	92,3	x	-
49	Geranyl acetate	1379	1379	92,7	x	-
50	$\alpha$ -Bourbonene	1385	1374	93,7	x	-
51	$\beta$ -Elemene	1392	1393	93,2	xx	-
52	Dodecanal	1414	1408	94,4	x	-
53	Caryophyllene	1422	1417	88,4	x	-
54	Unidentified	1433	-	-	-	x
55	Unidentified	1432	-	-	x	-
56	Unidentified	1466	-	-	x	-
57	$\alpha$ Ionone	1482	1485	96	-	x
58	Germacrene D	1487	1484	88,8	xx	-
59	$\alpha$ Selinene	1502	1498	82,6	x	-
60	$\gamma$ -Cadinene	1518	1513	94	x	-
61	$\Delta$ -Cadinene	1523	1522	88,2	x	-
62	Elemol	1555	1548	95,3	x	-
63	Germacrene D-4-ol	1588	1574	94,1	x	-

x – composto minoritário; xx – composto mediano; xxx – composto majoritário presentes 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> Similaridade entre o espectro de massas do pico e o espectro de massas da biblioteca

- Dados não disponíveis ou ausente na amostra

### 3.7. Atividade nematicida de COVs encontrados nas emissões gasosas de *C.*

#### *nardus* e *D. ambrosioides*

As moléculas Isopulegol, Dodecano e  $\alpha$ -Ionone selecionadas para utilização no ensaio *in vitro* contra J<sub>2</sub> de *M. incognita* individualmente não apresentaram toxicidade aos nematoides nas concentrações utilizadas, quando comparadas com o controle ( $p > 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

As imobilidades de J<sub>2</sub> de *M. incognita* diferenciadas entre as emissões de voláteis nas 18 espécies de plantas estudadas neste trabalho, destacando-se apenas as espécies *C. nardus* e *D. ambrosioides* com potencial para a produção de voláteis mortais a *M. incognita*, demonstra a importância de *screening* de espécies vegetais, como tem sido feito por outros pesquisadores (BARROS et al., 2014b; SILVA et al., 2018). Os valores diferenciados de toxicidade *in vitro* nas emissões de diferentes quantidades de macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides* confirmam o aspecto quantitativo de sua produção por plantas como demonstrado em outros trabalhos (BARROS et al., 2014b; LÓPZEZ et al., 2017a, SILVA et al., 2018). Barros et al. (2014b) também encontraram emissões diferenciadas de toxicidade (*in vitro*) entre as espécies *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan*.

A quantidade de metabólitos secundários tóxicos a J<sub>2</sub> é influenciada ainda pela idade da planta, sua reprodução, hormônios, estações do ano, horas do dia e condições de cultivo (CASTRO et al., 2010; SÁ et al., 2015). Torres et al. (2003) identificaram  $\alpha$ -felandreno como composto majoritário de *D. ambrosioides* no verão, enquanto que no outono, majoritários foram os  $\alpha$ -pineno e limoneno. Essa diferença na quantidade de metabólitos produzidos pode ser o motivo pelo qual os COVs emitidos por *D. ambrosioides* e *C. nardus* causaram percentagens de mortalidade diferentes neste trabalho.

A exposição de água aos voláteis de *C. nardus* e *D. ambrosioides* tornaram-na tóxica a J<sub>2</sub> de *M. incognita*, por conseguinte as moléculas tóxicas são temporariamente retidas na água (SILVA et al., 2018; TERRA et al., 2017, 2018). COVs emitidos por fungos e macerados de outras espécies, bem como vapores de etanol, também podem tornar tóxica a água a fitonematoides após a exposição (BARROS et al., 2014b; LÓPEZ et al., 2017b; SILVA et al., 2017; TERRA et al., 2017). A retenção de COVs na água pode estar associada à solubilidade da molécula. Por se tratar de uma molécula polar, a água é capaz de solubilizar em maiores quantidades compostos que também sejam polares devido as interações moleculares, como ligações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio (RUIZ et al., 1998). Dessa forma, estudos futuros são necessários a fim de testar a aplicação de uma mistura sintética dos voláteis emitidos pelos macerados em água de irrigação para o controle de nematoides.

A redução do número de galhas e ovos de *M. incognita* no sistema radicular do tomateiro após a exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs emitidos pelos macerados de *C. nardus* e *D. ambrosioides*, mostra que, embora não tenha ocorrido a mortalidade, a capacidade de infecção e reprodução dos J<sub>2</sub> foram afetadas. Acredita-se que os voláteis possam causar danos no sistema nervoso do nematoide, interferindo na sua capacidade de localizar as raízes do hospedeiro e localizar as células adequadas para a formação dos sítios de alimentação, que são responsáveis por proporcionar nutrientes a fêmea para a produção dos ovos (BARROS et al., 2014b; TERRA et al., 2017). Alguns trabalhos tiveram resultados semelhantes utilizando COVs emitidos por *Fusarium* spp. que causaram a redução na infectividade e reprodução de *M. incognita* (FREIRE et al., 2012; LÓPEZ et al., 2017b; TERRA et al., 2017). A utilização de outros macerados vegetais como os de nim, mostarda e torta de algodão, também emitiram COVs que causaram a imobilidade

dos J<sub>2</sub> e reduziram o número de galhas e de ovos de *M. incognita* em plantas de tomate (BARROS et al., 2014b; LÓPEZ et al., 2017a).

O aumento da imobilidade dos J<sub>2</sub> e a redução no número de galhas e ovos de *M. incognita* pelos COVs liberados pela mistura de macerados de *C. nardus* ou *D. ambrosioides* e o substrato, e retidos na superfície do substrato em recipiente fechado, indica que, na biofumigação, o componente gasoso está envolvido na eficácia do controle de *M. incognita*. Já é comprovado que outras plantas podem também emitir COVs tóxicos a fitonematoides em mistura com substratos (BARROS et al., 2014a; AISSANI et al., 2015; LÓPEZ et al., 2017a). Deve-se ressaltar que, no campo, a eficácia da biofumigação é aumentada pela cobertura do substrato, em mistura com tecido da planta triturado, com um plástico transparente, evitando sua perda para atmosfera (NEVES et al., 2007; LORD et al., 2011). No presente trabalho, os testes *in vivo* com o tomateiro demonstraram que a toxicidade dos macerados vegetais em mistura com o substrato está relacionada, não somente, com as moléculas voláteis, mas aditivamente com as moléculas não voláteis presentes nos tecidos vegetais, quando galhas e ovos de *M. incognita* foram reduzidas em plantio nos copos. Acredita-se ainda, que a irrigação após a incorporação do material vegetal triturado no solo possa aumentar a supressividade a nematoides. Isso ocorre, pois algumas moléculas voláteis com efeito nematicida podem ficar retidas na água presente no solo por mais tempo, aumentando as chances de alcance pelo nematoide, que se movimenta pela água (TERRA et al., 2017).

A alta eficácia tóxica das emissões de *C. nardus* e *D. ambrosioides* constatadas neste trabalho, ao que tudo indica, está relacionada com a composição complexa de seus vapores, pois moléculas como 3-methyl-1-butanol, 2-ethylfuran, 2-hexenal, Benzaldehyde,  $\alpha$ -terpinene, Cymene, Limonene,  $\gamma$ -terpinene, Linalol, Citronellal, Decanal, Citronellol, (Z)-ascaridol, Geraniol, Citronellyl acetate, Eugenol, Dodecanal,

identificadas por cromatografia gasosa, já demonstraram atividade nematicida em outros estudos (CARVAJAL et al., 2001; CHITWOOD, 2002; KONG et al., 2007; KIM et al., 2008; ECHEVERRIGARAY et al., 2010; HUANG et al., 2010; BAI et al., 2011; FIALHO et al., 2012; LI et al., 2013; AISSANI et al., 2015). Além disso, 3-methylfuran e Hexanal constatadas neste trabalho causaram toxicidade a outros fitopatógenos (ZERINGUE e BHATNAGAR, 1994; WILKINS et al., 2000). As demais moléculas encontradas no cromatograma, entre elas Isopulegol, Dodecano e  $\alpha$ -Ionone não foram ainda estudadas quanto a toxicidade a fitonematoides. Os componentes majoritários de *C. nardus*, citronellal e, ascaridol, de *D. ambrosioides* tem demonstrado atividade nematicida (ECHEVERRIGARAY et al., 2010; BAI et al., 2011). No entanto, a ação conjunta das moléculas presentes nas emissões de *C. nardus* e *D. ambrosioides* ainda não foram estudadas.

As moléculas Isopulegol, Dodecano e  $\alpha$ -Ionone não tinham sua atividade nematicida relatada, sendo estudadas pela primeira vez neste trabalho. Embora seus voláteis testados neste trabalho individualmente não tenham sido eficientes no controle de J<sub>2</sub> de *M. incognita*, provavelmente possam apresentar alguma toxidez quando misturadas com outras moléculas (NTALLI et al., 2011; SILVA et al., 2013). Portanto, é importante identificar não só as moléculas voláteis emitidas por tecidos vegetais, mas também estudar o efeito isoladamente e em mistura sob fitonematoides, na possibilidade de encontrar, futuramente, substitutos de nematicidas altamente tóxicos que estão hoje no mercado (HELLER, et al., 2010; SASANELLI et al., 2014).

Em regiões tropicais e subtropicais, que são favoráveis ao desenvolvimento de *C. nardus* e *D. ambrosioides*, a biofumigação com essas espécies poderia constituir em alternativa viável no manejo de fitonematoides em sistemas agroecológicos. *C. nardus* já é utilizada em consórcio com outras culturas agrícolas devido as suas propriedades

repelentes (ROCHA et al., 2012). Já *D. ambrosioides* é considerada planta daninha para várias culturas no Brasil, sendo bastante encontrada em solos bem férteis, como os preparados para cultivos de olerícolas (LORENZI, 1982). Portanto *C. nardus* e *D. ambrosioides* emitem voláteis tóxicos a *M. incognita* que ficam retidos em água, além de emitirem também voláteis tóxicos após a incorporação no solo.

## 5. CONCLUSÕES

Quinze plantas emitiram COVs com efeito nematostático, sendo que duas delas (*C. nardus* e *D. ambrosioides*) emitiram COVs nematostáticos e nematicidas.

Os COVs emitidos por *C. nardus* e *D. ambrosioides* aumentaram a imobilidade e a mortalidade de J<sub>2</sub> e reduziram galhas e ovos quando os J<sub>2</sub> a eles expostos foram inoculados em tomateiro.

Os COVs emitidos por *C. nardus* e *D. ambrosioides* são retidos em água, tornando-a tóxica a J<sub>2</sub>.

Na biofumigação, COVs emitidos por *C. nardus* e *D. ambrosioides* em mistura com substrato e seus macerados causaram redução de galhas e de ovos em tomateiro, quando os J<sub>2</sub> de *M. incognita* foram a eles expostos.

## REFERÊNCIAS

ABAD et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 8, p. 909 – 915. 2008. DOI: 10.1038/nbt.1482.

AISSANI, N. et al. Nematicidal activity of the volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.63, n.27, p. 6120-6125, 2015.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, USA. 2007.

AMARAL, D. R. et al. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leida, v. 5, n. 6, p. 859–864, 2003. DOI: 10.1163/156854103773040763

ANDRÉS, M. F. et al. Nematicidal activity of essential oils: a review, **Phytochemistry Reviews**, The Netherlands, v. 11, n. 4, p. 371-390, 2012. DOI: 10.1007/s11101-012-9263-3

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990. DOI: 10.1021/ac00218a019

BAI, C. Q.; LIU, Z. L.; LIU, Q. Z. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium Ambrosioides* aerial parts. **E-Journal of Chemistry**, Campo Grande, v. 8, n. 1, p. 143-148, 2011. DOI: 10.1155/2011/470862

BARROS, A. F. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, Florenza, n.80, p.34–43, 2014a. DOI: 10.1016/j.apsoil.2014.02.011

BARROS, A. F. 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**, Flórida, v. 44, n. 2, p. 190-199, 2014b.

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T.; The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, Nantes, v. 67, p. 1053–1067, 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.02.024

CARVAJAL, J. A. C. et al. Changes in populations of microorganisms associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. **Nematropica**, Flórida, v. 31, p-165-179.

CASTRO, H. G. et al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

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

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, 2002. DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045

CORBANI, R. Z.; MAZZONETTO, F. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 5, n. 2, p. 61-66, 2013.

ECHEVERRIGARAY, S.; ZACARIA, J.; BELTRÃO, R. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leida, v. 100, n. 2, p. 199-203, 2010. DOI: 10.1094/PHYTO-100-2-0199

FIALHO, M.B. et al. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.2, p.152-154, 2012. DOI: 10.1590/S0100-54052012000200008

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**, Sacramento, v. 44, p.321-328, 2012.

GRAY, C. M.; MONSON, R. K.; FIERER, N. Emissions of volatile organic compounds during the decomposition of plant litter. **Journal of Geophysical Research**, Malden, v. 115, p. 1-9, 2010. DOI: 10.1029/2010JG001291

HELLER, J. J.; KORKMAZ, E.; CHARLES, P. Evaluation of the efficacy of DMDS using drip application for the control of root-kont nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Turkey. In: Gamliel, A., Coosemans, J. (eds). **VII International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate** Acta Hort., 2010.

HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal Plant Pathology**, Amsterdã, v. 126, p. 417-422, 2010. DOI: 10.1007/s10658-009-9550-z

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

INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**, Santa Maria, v.108, p. 4-9, 2008.

KERMANSHAI, R. et al. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. **Phytochemistry**, Nantes, v. 57, p. 427-435, 2001.

KIM, J. et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 16, p. 7316-7320, 2008. DOI: 10.1021/jf800780f.

KONG, J-O. et al. Nematicidal and propagation activities of thyme red and white oil compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: *Parasitaphelenchidae*). **Journal of Nematology**, Sacramento, v. 39, n. 3, p. 237–242, 2007.

LI, H.Q. et al. Chemical composition and nematicidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, Hong Kong, v. 18, p. 4170-4180, 2013. DOI: 10.3390/molecules18044170

LÓPEZ, L. E. et al. Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 42, p. 443–450, 2017a. DOI: 10.1007/s40858-017-0154-4

LÓPEZ, L. E. 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**, Brasília, 2017b. DOI: 10.1007/s40858-017-0202-0

LORD, J. S. 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 and Chemistry**, Easton, v. 59, p. 7882–7890, 2011. DOI: 10.1021/jf200925k

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. *Chenopodium ambrosioides* L. 1.ed. São Paulo: Ed. Nova Odessa Ltda., 38, 1982.

MACHADO, A. C. Z. Current nematode threats to Brazilian agriculture. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 20 n. 1, p. 26-35, 2014.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A., ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000800026

MARTINS, M da. C. B.; SANTOS, C. D. G. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 135-142, 2016. DOI: 10.5935/1806-6690.20160016

MORAES, S. R. G et al. Influência de leguminosas no controle de fitonematoides no cultivo orgânico de alface americana e de repolho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 188-191, 2006.

NEVES, W. S. et al. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 195-201, 2007.

NICOL, J. M. et al. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (eds). **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. Springer, Dordrecht, 21-43, 2011. DOI: 10.1007/978-94-007-0434-3\_2.

NIST, 2013. NIST Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 30 Jul. 2017.

NTALLI, N. G. et al. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, New Jersey, v. 67, p. 341–351, 2011. DOI: 10.1002/ps.2070

OJAGHIAN, M. R. et al. *In vitro* biofumigation of brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology Journal**, Gangnam-gu, v. 28, n. 2, p. 185-190, 2012. DOI: 10.5423/PPJ-OA-11-2011-0206

OSEI, K. et al. Management of plant parasitic nematodes with antagonistic plants in the forest-savanna transitional zone of Ghana. **Journal of Applied Bioscience**, Nairobi, v. 37, p. 2491-2495, 2011.

ROCHA, H. C. R. et al. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de folhas de capim citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) em cultivo consorciado com algodoeiro colorido no semiárido mineiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, p. 183-187, 2012. DOI: 10.1590/S1516-05722012000500010.

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 and Technology**, Berkeley, v. 32, p. 1079–1084, 1998. DOI: 10.1021/es9704996.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SANTANA, S. M. et al. Manejo de *Pratylenchus zae* por plantas antagonistas em solos de áreas de cultivo de cana-de-açúcar. **Nematropica**, Flórida, v. 42, n. 1, p. 63-71, 2012.

SASANELLI, N. et al. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Dimethyl Disulfide (DMDS) applied in drip irrigation on melon and tomato in apulia and basilicata (Italy). **Acta Horticulturae**, Bruxelas, v. 1044, p. 401-404, 2014. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1044.54

SILVA, J. C. P. et al. Plant volatiles reduce the viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* either directly or when retained in water. **Plant Disease**, Ames, 2018.

SILVA, J.C.P da. et al. Toxicity of ethanol solutions and vapours against *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leida, v. 19, n. 3, p. 271 – 280, 2017. DOI: 10.1163/15685411-00003046

SILVA, W. R. J. et al. Volatile organic compounds for the control of *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, p. 375-386, 2013. DOI: 10.1590/S1982-56762013000500002

SOUSA, R. M. O. F. et al. Larvicidal, molluscicidal and nematocidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. **Journal of Pest Science**, Tokyo, v. 88, n. 2, p. 413-426, 2014. DOI: 10.1007/s10340-014-0628-9.

TERRA, W. C. et al. Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, College Station, v. 112, p. 34–40, 2017. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.06.004

TORRES, A. M. et al. Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. (paico). **Facena**, Corrientes, v. 19, p. 27-32, 2003.

WILKINS, K.; LARSEN, K.; SIMKUS, M. Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. **Chemosphere**, Sydney, v. 41, p. 437-446, 2000. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00273-8

ZERINGUE, H. J.; BHATNAGAR, D. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Olympia, v. 60, p. 3543–3547, 1994.

## ARTIGO 2

### Voláteis emitidos por agrião e maracujá são tóxicos a fitonematoides

Marcela F Silva<sup>a</sup>, Vicente P Campos<sup>a,\*</sup>, Aline F Barros<sup>a</sup>, Márcio P Pedroso<sup>b</sup>, Willian C Terra<sup>a</sup>, Vanessa A Gomes<sup>a</sup>, Clerio R Ribeiro<sup>a</sup>

#### RESUMO

Plantas emitem compostos orgânicos voláteis (COVs) com funções <sup>b</sup>diversas, sendo uma delas a defesa contra fitopatógenos. COVs tóxicos a fitonematoides têm sido encontrados em algumas plantas, porém não tinham sido pesquisados em macerados de agrião (*Nasturtium officinale*) e maracujá (*Passiflora edulis*). Quantidades (0,2 a 2 g) de macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá, causaram 100% de imobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* e reduziram galhas e ovos do nematoide quando os J<sub>2</sub> foram inoculados em tomateiro após exposição aos COVs. A água exposta aos COVs produzidos por agrião, causou imobilidade e mortalidade dos J<sub>2</sub>. Na biofumigação, os COVs emitidos causaram imobilidade dos J<sub>2</sub>, ocorrendo redução de galhas e ovos de *M. incognita*. Nos macerados de agrião e maracujá foram encontrados 26 e 12 compostos, respectivamente, pela análise em GC-MS. A molécula 1-Octanol apresenta atividade nematicida aos J<sub>2</sub>, com LC<sub>50</sub> 382, 5 µg / mL. Os COVs emitidos pelas espécies vegetais são tóxicos a *M. incognita in vitro* e *in vivo*, e na biofumigação. A água exposta aos COVs de agrião foi tóxica aos J<sub>2</sub>. Nos macerados de agrião e maracujá foram identificados, respectivamente, 26 e 12 compostos, sendo demonstrado que a molécula 1-Octanol é tóxica a *M. incognita* com LC<sub>50</sub> 382, 5 µg / mL.

**Palavras-chave:** Nematoide das galhas. Compostos Orgânicos Voláteis. *Nasturtium officinale*. *Passiflora edulis*. Biofumigação.

#### Volatiles emitted by watercress and passion fruit are toxic to phytonematodes

#### ABSTRACT

Plants emit volatile organic compounds (VOCs) with diverse functions and, one of them is being a defense against phytopathogens. VOCs that are toxic to phytonematoids have

<sup>a</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, CP3037, Lavras, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, CP3037, Lavras, Minas Gerais, Brazil

\* Autor correspondente: Vicente Paulo Campos ([vpcampos@dfp.ufla.br](mailto:vpcampos@dfp.ufla.br)). Phone: (55) (35) 3829-1469

been found in some plants but have not been investigated in watercress macerates (*Nasturtium officinale*) and passion fruit (*Passiflora edulis*). Quantities (0.2 to 2 g) of cress leaves and passion fruit seeds caused 100% immobilization of *M. incognita* J<sub>2</sub> and reduced galls and nematode eggs when J<sub>2</sub> were inoculated in tomato after exposure to VOCs. Water exposed to VOCs produced by watercress caused immobility and mortality of J<sub>2</sub>. In biofumigation, the VOCs emitted caused immobility of the J<sub>2</sub>, resulting in reduction of galls and eggs of *M. incognita*. In macerated watercress and passion fruit 26 and 12 compounds were found, respectively, by GC-MS analysis. The 1-Octanol molecule exhibits nematicidal activity at J<sub>2</sub>, with LC<sub>50</sub> 382, 5 µg / mL. The VOCs emitted by plant species are toxic to *M. incognita* in vitro and in vivo, and in biofumigation. Water exposed to watercress VOCs was toxic to J<sub>2</sub>. Macerated watercress and passion fruit had 26 and 12 compounds, respectively, and the 1-octanol molecule was shown to be toxic to *M. incognita* with LC<sub>50</sub> 382.5 µg / mL.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são responsáveis pela redução de 11% da produção agrícola mundial. Em regiões tropicais e subtropicais, os danos causados nas principais culturas chegam a quase 15% (MC CARTER, 2008; NICOL et al., 2011). Entre eles destaca-se o *Meloidogyne incognita*, que tem ampla gama de hospedeiros e é considerada a espécie que mais causa perdas na produção mundial de alimentos (TRUDGILL e BLOCK, 2001).

O controle dos fitonematoides é necessário para reduzir tais prejuízos, sendo que o uso de nematicidas é uma alternativa economicamente viável. As indústrias buscam novas moléculas para o mercado e os compostos orgânicos voláteis (COVS) podem ser uma alternativa, pois eles não deixam resíduos nos alimentos e no meio ambiente (BARROS et al., 2014a). A atividade nematicida de COVs emitidos por plantas e microrganismos tem sido estudada nas últimas décadas (CAMPOS et al., 2010). Fungos e bactérias são os microrganismos mais estudados quanto a emissão de COVs tóxicos a fitopatógenos (FREIRE et al., 2012; AGUIAR et al., 2014; LÓPEZ et al., 2017a; TERRA et al., 2017). Alguns materiais vegetais também emitem COVs com atividades nematicida e nematostática (BARROS et al., 2014a; AISSANI et al., 2015; LÓPEZ et al., 2017b). No entanto, há várias espécies vegetais que não foram estudadas com relação a emissão de moléculas voláteis tóxicas a fitonematoides.

O efeito tóxico de COVs à fitonematoides pode ser ressaltado através da biofumigação (BONES et al., 2006; LORD et al., 2011; BARROS et al., 2014b). Por exemplo, os isotiocianatos são moléculas voláteis emitidas por brássicas com efeito nematicida comprovado, sendo um dos principais compostos relacionados ao processo de biofumigação (BONES et al., 2006; AIRES et al., 2009; OJAGHIAN et al., 2012; BARROS et al., 2014b; MARTINS et al., 2016). Porém, outras moléculas voláteis também podem estar associadas à toxicidade a nematoides.

As emissões gasosas são complexas, contendo compostos com ações diferenciadas quanto a toxicidade a fitonematoides. Assim, a identificação de moléculas nas emissões gasosas de plantas e microrganismos, precede ao teste sobre efeito isolado desses compostos voláteis a fitonematoides (JARDIM et al., 2017; LÓPEZ et al., 2017b; NEERAJ et al., 2017; SILVA et al., 2017), afim de encontrar novas moléculas nematicidas que sejam menos tóxicas ao ambiente e a saúde humana. Assim, tem-se estudado geralmente o composto majoritário identificado em alguns extratos e óleos essenciais de planta (KONG et al., 2007; BAI et al., 2011; NEERAJ et al., 2017).

A dissolução de moléculas componentes de emissões gasosas em água expande o espaço de atuação das moléculas voláteis na rizosfera. A toxicidade adquirida pela água exposta aos COVs emitidos por macerados vegetais, fungos e etanol, foi estudada nos últimos anos (BARROS et al., 2014a; LÓPEZ et al., 2017a; SILVA et al., 2017; TERRA et al., 2017). Esses trabalhos comprovaram a retenção de alguns COVs na água devido a sua dissolução, o que prolonga o seu efeito tóxico a fitonematoides e evita sua perda para a atmosfera. Ainda não foi estudada a capacidade de emissões gasosas de *Nasturtium officinale* (agrião) e *Passiflora edulis* (maracujá) bem como a sua retenção em água.

O maracujá é nativo do Brasil e sua produção é destinada principalmente para a produção de sucos, onde são geradas 54 mil toneladas de subprodutos descartados anualmente, incluindo sementes e cascas (VARGAS et al., 2013; SANTOS et al., 2015). A sua toxicidade a nematoides ainda precisa ser estudada, porém o óleo extraído das sementes possui propriedades antifúngicas (SILVA et al., 2014). A semente de maracujá é um resíduo abundante da indústria alimentícia e seu uso na agricultura no controle de fitonematoide pode vir a ser economicamente viável após comprovada sua ação nematicida.

O agrião pertence à família das brássicas e suas folhas frescas constituem o produto comercial, utilizadas principalmente na alimentação (CRUZ et al., 2008). Sua atividade nematicida já foi comprovada através de extratos aquosos das folhas e da biofumigação (AIRES et al., 2009; LORD et al., 2011; ZAHRADNÍKOVÁ e PETRÍKOVÁ, 2013) e explicada pela produção de glucosinolatos e seus derivados, chegando ao isotiocianato (SERRA et al., 2002; CABONI et al., 2012; OJAGHIAN et al., 2012) sem intuir sobre o efeito de outras moléculas componentes da emissão nem sobre a dissolução dos vapores em água, carecendo assim de maiores estudos.

Foi avaliado, neste trabalho, o efeito tóxico a *M. incognita in vitro* e *in vivo* de COVs emitidos por macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá, a retenção em água de moléculas tóxicas, a eficácia e produção de voláteis tóxicos pela biofumigação, a caracterização das moléculas das emissões e o efeito tóxico isolado de algumas delas a *M. incognita*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção do inóculo de *M. incognita***

Populações puras de *M. incognita* foram multiplicadas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Santa Clara<sup>®</sup>, mantidas em casa-de-vegetação. Sessenta dias após a inoculação, ovos do nematoide foram extraídos das raízes com galhas, de acordo com a técnica de Hussey e Barker (1973), e colocados em câmara de eclosão a 28°C. Os J<sub>2</sub> eclodidos entre 24-48 h foram utilizados para os experimentos.

### **2.2. Coleta de material vegetal e preparo dos macerados**

Sementes de maracujá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) e folhas frescas de agrião (*Nasturtium officinale*) cultivar Folha larga melhorada<sup>®</sup> foram escolhidas como as fontes de emissão de voláteis nos ensaios. As sementes de maracujá foram lavadas em água corrente para retirada do arilo e colocadas para secar a temperatura ambiente em bandejas de alumínio cobertas com papel toalha para absorção da água. Para o preparo do macerado fresco, amostras de folhas de agrião e sementes de maracujá foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto, seguido de três lavagens em água destilada. Após a retirada do excesso de água com papel toalha, o material vegetal foi colocado em almofariz e macerado com pistilo. O material triturado foi utilizado imediatamente para condução dos ensaios.

### **2.3. Imobilidade, mortalidade, infectividade e reprodução de *M. incognita* exposta aos COVs emitidos pelas espécies vegetais**

A atividade nematicida dos COVs emitidos por macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá, foi avaliada pela metodologia desenvolvida por Barros et al. (2014a), onde em frascos Supelco™ (80 cm x 28 mm, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) foram depositados areia autoclavada (35 g) e, na superfície da areia, adicionou-se água destilada (2 mL). A seguir, diferentes quantidades de macerado vegetal (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g) foram adicionados sobre a areia contida nos frascos. Frascos com 2 mL de água sobre a areia e sem material vegetal foram utilizados como controle. Um microtubo (1,5 mL) esterilizado e sem tampa foi imerso até a sua metade na areia de cada frasco. Logo em seguida, os frascos foram fechados com tampa de rosca e mantidos a 25°C durante 72 h para a emissão e acúmulo dos COVs. Ao final do período, uma suspensão (1 mL) contendo 200 J<sub>2</sub> de *M. incognita* foi injetada dentro do microtubo, por meio de uma seringa, através de uma película de silicone contida na tampa rosqueada, sendo armazenado novamente por 24 h. O orifício da passagem da seringa foi vedado com fita adesiva. Decorridas 24 h, os frascos Supelco™ foram abertos e de cada microtubo foram retirados 100 µL da suspensão de J<sub>2</sub>. Os J<sub>2</sub> foram transferidos para poços de 300 µL em placas de polipropileno de 96 células, 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 a contagem da imobilidade, considerando os J<sub>2</sub> ainda imóveis como mortos.

Para avaliar a infectividade, uma suspensão aquosa (1 mL) contendo 580 J<sub>2</sub> foi exposta aos COVs emitidos pelos macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá, como descrito acima. Duas quantidades (0,5 e 2,0 g) de macerados foram selecionadas para este ensaio. Os J<sub>2</sub> foram expostos aos COVs por 24 h. Decorrido este período, os J<sub>2</sub> foram dispersos em 3 mL de água destilada e, então, inoculados em plantas de tomate cultivar Santa Clara® com 20 dias após a semeadura e cultivadas em bandejas de isopor com 72 células de 75 cm<sup>3</sup> preenchidas com substrato comercial (Tropstrato®, Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Ltda., Mogi Mirim, São Paulo, Brasil). O inóculo foi injetado em volta do caule da planta através de 3 furos equidistantes (0,4 cm de largura x 1,5 cm de profundidade). As plântulas inoculadas receberam irrigação e adubação foliar (Biofert Plus Universal®, Biofert, Contagem, Minas Gerais, Brasil) sempre que necessário. Após 45 dias, as raízes foram cuidadosamente removidas, lavadas com água,

secas em toalhas de papel e pesadas. Após a quantificação das galhas, os ovos foram extraídos<sup>30</sup> para sua contagem em microscópio de objetiva invertida (BARROS et al., 2014a).

#### **2.4. Toxicidade da água aos J<sub>2</sub> de *M. incognita* após a exposição aos COVs das plantas**

Como no ensaio anterior em frascos Supelco™ foram adicionados 35g de areia autoclavada. Na superfície da areia foi depositada também água destilada (2mL) seguida dos macerados vegetais (1,5 g). Dentro de cada frasco também foi colocado um microtubo (2 mL) contendo água destilada (1 mL) no seu interior. Em seguida, os frascos foram fechados e mantidos a 25 °C durante 72 h. Como controle positivo foi utilizado o macerado seco da inflorescência de brócolis (1,5 g), que apresenta toxicidade a *M. incognita* (SILVA et al., 2018). Como controle negativo, foi utilizado frascos contendo areia e microtubo com água. Após 72 h, os microtubos foram retirados do interior dos frascos. Dentro de cada microtubo foi injetada uma suspensão (0,5 mL) contendo 200 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Os microtubos foram, então, fechados com tampa rosqueada e mantidos a 25 °C por 48 h. Após o período de incubação, os microtubos foram abertos, 100 µL da suspensão de J<sub>2</sub> foram recolhidos dos microtubos e transferidos para poços de 300 µL em placas de polipropileno de 96 células, sendo quantificado 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 a contagem da imobilidade. Os J<sub>2</sub> ainda imóveis foram considerados mortos.

#### **2.5. Biofumigação de substrato misturado com diferentes quantidades dos macerados vegetais e ovos de *M. incognita* e toxicidade aos J<sub>2</sub> dos voláteis liberados pelos macerados vegetais**

Foi adotada a metodologia desenvolvida por Barros et al (2014b) e López et al. (2017b), onde copos de poliestireno (300 mL) foram preenchidos com substrato comercial (100 g) Tropstrato®. Em seguida, os macerados vegetais de sementes de maracujá e folhas frescas de agrião, nas quantidades de 0; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g, foram incorporados ao substrato. A quantidade zero grama foi considerada controle. Em saco de polipropileno (30 x 40 cm – 1 kg) foram colocados substrato, macerado vegetal e uma suspensão aquosa (2,5 mL) contendo 3.000 ovos de *M. incognita*. O saco plástico foi fechado e agitado para homogeneização. Dessa forma, os ovos foram submetidos aos

efeitos de moléculas voláteis e não voláteis. Logo após, a mistura (substrato:macerado:ovos) foi colocada nos copos plásticos, ajustando-se a umidade para 60% da capacidade de campo. Para se estudar isoladamente o efeito dos COVs sem interferência das moléculas não voláteis, foi colocado um microtubo (1,5 mL) aterrado até sua metade na mistura. O copo com a mistura foi então fechado com tampa de poliestireno própria, formando a câmara de gases liberados pela mistura. Setenta e duas horas após, foi injetada, com uma seringa, uma suspensão aquosa (1 mL) contendo 200 J<sub>2</sub> de *M. incognita* no interior do microtubo. O furo provocado na tampa pela perfuração da seringa foi vedado com fita adesiva. Após 48 h de exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs, o copo foi aberto e 100 µL da suspensão de J<sub>2</sub> de cada microtubo foi transferida para poços de 300 µL em placas de polipropileno de 96 células sendo avaliada a imobilidade de J<sub>2</sub>. A mortalidade foi avaliada 24 h após a avaliação da imobilidade. Sem as tampas dos copos, uma plântula de tomateiro contendo quatro pares de folhas foi transplantada para cada copo contendo a mistura de substrato, macerados e ovos de *M. incognita*. Aos 45 dias foi avaliado o número de galhas e de ovos por sistema radicular.

## **2.6. Identificação dos COVs emitidos pelos macerados vegetais através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**

Através da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), foram analisadas as emissões gasosas de amostras (1,5 g) em cinco replicatas dos macerados de sementes de macarujá e folhas de agrião. As amostras foram colocadas em frascos de SPME (20 mL) incubadas a 25°C. Foram analisados os voláteis emitidos durante 72 h após o fechamento dos tubos. Para a extração dos COVs foi empregada a SPME (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990) no modo *headspace*, usando a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano), com temperatura (55°C), agitação (250 rpm) e tempo de extração (35 minutos) determinados. Para a separação e identificação dos COVs o cromatógrafo a gás foi acoplado a um 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, 2017). 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 for maior que 80%.

### **2.7. Atividade nematocida dos COVs identificados nas emissões gasosas dos macerados vegetais**

Foi avaliada a atividade nematocida a *M. incognita* de cinco moléculas identificadas nas emissões dos macerados vegetais, disponíveis no mercado e de baixo custo. As moléculas 2-Metil-1-propanol, 2-Etil-1-hexanol, 1-Octanol, Isopulegol e  $\alpha$ -Ionone foram fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich, Saint Louis – MO, USA. Para avaliar as suas atividades nematocidas, uma suspensão aquosa (0,5 mL) com 200 J<sub>2</sub> e a solução (0,5 ml) contendo as moléculas nas concentrações finais de 1000 µg / mL e 500 µg / mL em solução aquosa de Tween 80<sup>®</sup> a 0,01 g / mL, foram adicionados em um microtubo (1,5 mL). Solução de Tween 80<sup>®</sup> a 0,01 g / L foi utilizado como controle. Os microtubos foram

fechados e mantidos a 25 °C por 48h. Após o período, uma alíquota (100 µL) foi transferida para poços de 300 µL em placas de polipropileno de 96 células. Para determinar se os J<sub>2</sub> estavam vivos, uma gota (10 µL) de NaOH 1M 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 e DICKSON, 2000 adaptado por AMARAL et al., 2003). Somente as moléculas que causaram mortalidade acima de 80% foram selecionadas para determinação da concentração letal capaz de matar 50% dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* (CL<sub>50</sub>). A molécula selecionada (1-octanol) para este ensaio foi avaliada em 10 concentrações diferentes (500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 e 50 µg / mL). Solução de Tween 80<sup>®</sup> a 0,01 g / L e água foram empregados como controles. O período de exposição de J<sub>2</sub> aos COVs foi de 48 h, sendo avaliada a mortalidade através da adição de duas gotas de solução de NaOH 1,0 mol/L em cada cavidade da placa com os J<sub>2</sub>. Aqueles que reagiram ao NaOH, movimentando o seu corpo num intervalo de 3 minutos foram considerados vivos, caso contrário, foram considerados mortos (CHEN e DICKSON, 2000 adaptado por AMARAL et al., 2003).

## 2.8. Análise estatística dos dados

Todos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Os resultados 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). No ensaio sobre a toxicidade da água a J<sub>2</sub> após a exposição aos COVs, foi feita a transformação dos dados relativos à mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* a  $\sin^{-1}\sqrt{\frac{x}{100}}$ .

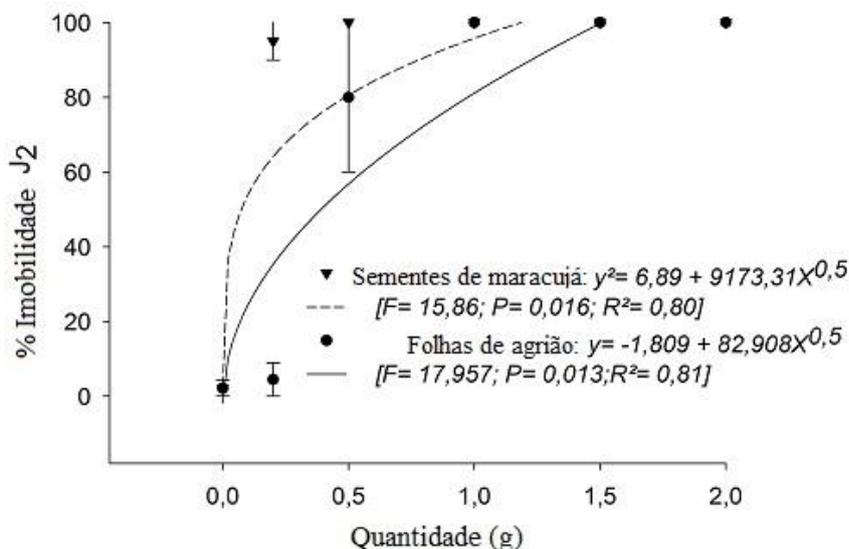
No ensaio de reprodução e infectividade com J<sub>2</sub> expostos aos COVs das plantas, foi feito um esquema fatorial com 2 espécies vegetais (*N. officinales* e *P. edulis*) x 3 quantidades (0,0; 0,5 e 2,0 g). Em relação aos experimentos de quantidade dos macerados

vegetais e biofumigação no copo juntamente com os voláteis liberados ao ar, os tratamentos foram organizados em esquemas fatoriais com 2 espécies vegetais (*N. officinales* e *P. edulis*) x 6 quantidades (0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g) e 2 espécies vegetais (*N. officinales* e *P. edulis*) x 5 quantidades (0,0; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g), respectivamente, sendo feita uma análise de regressão. Para o ensaio de atividade nematicida dos COVs foi usado um esquema fatorial com 5 moléculas x 3 concentrações (0, 500 e 1000 µg/mL). As médias dos ensaios foram comparadas pelo teste de Tukey a 0.05 de significância. Já para o ensaio de determinação da CL<sub>50</sub>, foi feita uma análise de regressão com 10 concentrações diferentes. Para os ensaios de análise de regressão, foram escolhidos os melhores modelos para as curvas de regressão. Os programas SigmaPlot® versão 12 e Sisvar® foram utilizados para montagem dos gráficos e análises estatísticas, respectivamente.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Imobilidade, mortalidade, infectividade e reprodução de *M. incognita* exposta aos COVs emitidos pelas espécies vegetais**

Os COVs produzidos pelos macerados de maracujá e agrião causaram alta imobilidade aos J<sub>2</sub> de *M. incognita*. A menor quantidade de macerado (0,2 g) de sementes de maracujá imobilizou 95% dos J<sub>2</sub>. A partir de 0,5 g, 100% dos J<sub>2</sub> ficaram imóveis. Os COVs emitidos pelo agrião causaram 100% de imobilidade somente a partir da quantidade de 1 g do macerado (Fig. 1). Os COVs emitidos pelos macerados das duas espécies vegetais, expostos aos J<sub>2</sub> por 24h, não causaram mortalidade significativa do nematoide ( $p > 0.001$ ).



**Figura 1.** Porcentagem de imobilidade de juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita* expostos a compostos orgânicos voláteis emitidos por macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá em diferentes quantidades. As barras indicam o erro padrão da média.

A infectividade e reprodução de *M. incognita* quando os  $J_2$  foram expostos aos COVs de macerado de agrião diminuíram com o aumento da quantidade de macerado vegetal (0,5 e 2,0 g) e também em comparação com o controle (0,0 g) ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no número de galhas entre as duas quantidades de macerado de agrião e o controle, chegando a 89% e 84% de redução comparando 2g do macerado com o controle e com a quantidade de 0,5 g, respectivamente. Ocorreu diferença significativa na infectividade entre agrião e maracujá com redução de 86% quando os  $J_2$  foram expostos aos COVs emitidos por 2 g de agrião em comparação ao maracujá. Os  $J_2$  expostos aos COVs de 2,0 g de macerado de maracujá causaram redução significativa no número de galhas ( $p < 0,05$ ). O número de ovos diminuiu significativamente quando se utilizou 2 g dos macerados de agrião (99%) e maracujá (82%), em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ). Porém, a infectividade não foi significativa entre as espécies de plantas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

### Tabela 1

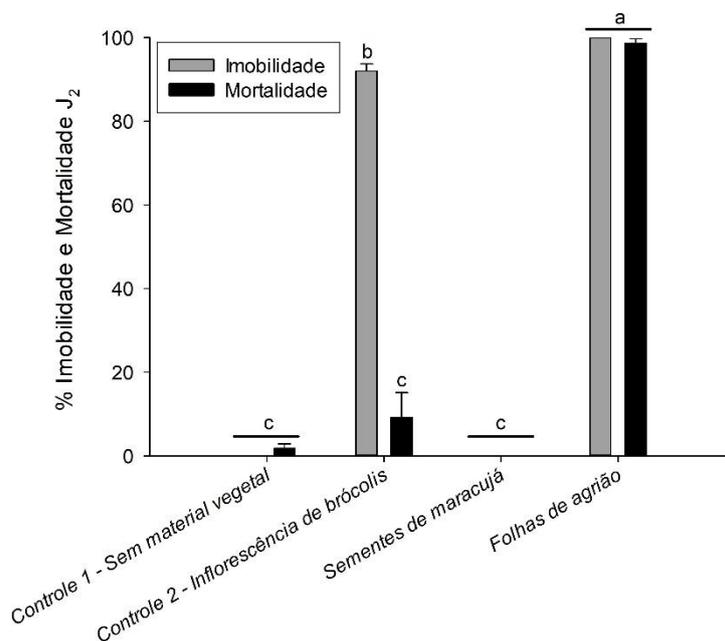
Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro inoculadas com juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após a exposição a compostos orgânicos voláteis emitidos por duas quantidades (0,5 e 2,0 g) de macerados de folhas agrião e sementes de maracujá.

Macerado vegetal (g)	Galhas.g <sup>-1</sup> de raiz		Ovos.g <sup>-1</sup> de raiz	
	Agrião	Maracujá	Agrião	Maracujá
0,0	19 cA	19 bA	1820 bA	1820 bA
0,5	13 bA	16 abA	1462 bA	1644 bA
2,0	2 aA	15 aB	5 aA	335 aA

Letras maiúsculas diferentes na linha e letras minúsculas diferentes na coluna indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Toxicidade de água exposta aos COVs dos macerados vegetais aos J<sub>2</sub> de *M. incognita*

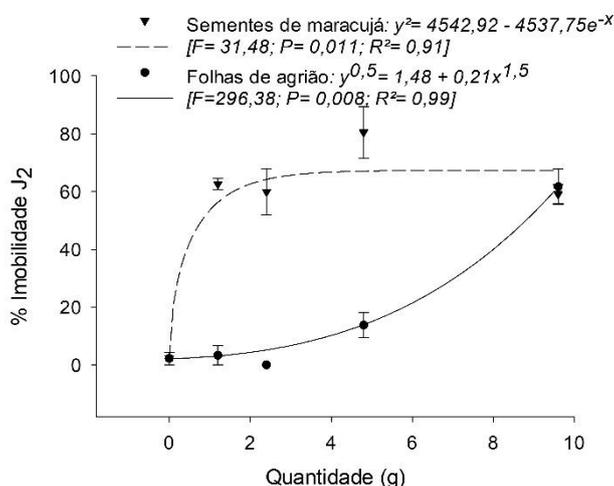
A água exposta aos COVs emitidos pelo macerado de agrião causou 100% de imobilidade e 98,6% de mortalidade dos J<sub>2</sub>, sendo estatisticamente ( $p < 0.05$ ) superior ao controle positivo (macerado de brócolis). No entanto, a água exposta aos COVs emitidos por macerado de sementes de maracujá não afetou a mobilidade e nem a mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita*, sendo estatisticamente ( $p > 0.05$ ) similar ao controle negativo (Fig. 2).



**Figura 2.** Toxicidade da água exposta a compostos orgânicos voláteis de folhas de agrião e sementes de maracujá expressa em porcentagem de imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* em relação aos controles: (1) frasco sem macerado vegetal e (2) brócolis. Letras diferentes entre os tratamentos indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média.

### 3.3. Biofumigação de substrato misturado com diferentes quantidades dos macerados vegetais e ovos de *M. incognita* e toxicidade aos J<sub>2</sub> dos voláteis liberados pelos macerados vegetais

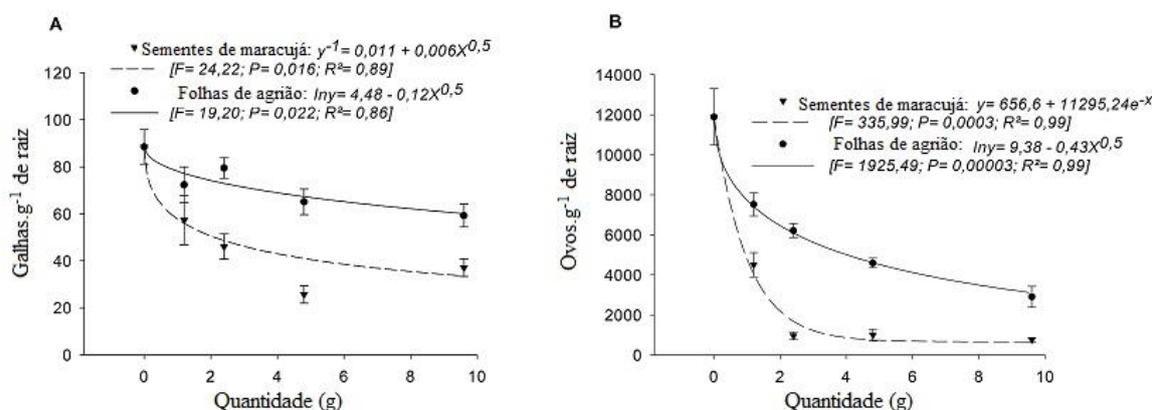
A imobilidade dos J<sub>2</sub> expostos aos voláteis emitidos pela mistura com macerado de maracujá foi quase sempre maior comparado àqueles emitidos pela mistura com agrião. Houve imobilização significativa ( $p < 0.001$ ) dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* expostos aos COVs emitidos pela mistura de macerado de maracujá ou agrião ao substrato a partir de 1,2 g e 4,8 g, respectivamente, em comparação com o controle (0,0 g). A porcentagem máxima de imobilidade foi de 85,5% para maracujá e de 62% para o agrião (Fig. 3). Os COVs emitidos pelos macerados das duas plantas não causaram a mortalidade dos J<sub>2</sub>.



**Figura 3.** Porcentagem de imobilidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* expostos a compostos orgânicos voláteis emitidos por diferentes quantidades de macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá incorporados ao substrato em copos fechados, simulando o processo de biofumigação. As barras indicam o erro padrão da média.

A maior redução no número de galhas foi observada quando foi utilizado macerados de maracujá (69%) em comparação aos macerados de agrião (33%). Qualquer quantidade de macerado de semente de maracujá reduziu significativamente o número de galhas em tomateiro comparado ao controle ( $p < 0.001$ ). Já os COVs do macerado de agrião só causaram redução significativa comparada ao controle a partir de 4,8 g (Fig. 4 A). Os macerados das duas espécies vegetais causaram redução significativa ( $p < 0.001$ ) no número de ovos em comparação com o controle em todas as quantidades testadas. Para macarujá, a menor quantidade (1,2 g) reduziu em 62% o número de ovos, sendo que a partir da quantidade de 4,8 g, a redução foi acima de 90%. Para os macerados de agrião,

só houve redução acima de 60% a partir de 4,8 g, chegando a 76% de redução com a aplicação de 9,6 g do macerado vegetal (Fig. 4 B).



**Figura 4.** Número de galhas (A) e ovos (B) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro, resultantes da exposição de ovos de *M. incognita* no solo às diferentes quantidades de macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá incorporados ao substrato em copos fechados, simulando o processo de biofumigação. As barras indicam o erro padrão da média.

### 3.4. Identificação dos COVs emitidos pelos macerados vegetais através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Nas emissões voláteis emitidas pelos macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá foram encontrados 26 e 12 compostos, respectivamente, através de análises em GC-MS. Somente uma molécula não foi identificada. Os compostos identificados nas emissões foram categorizados como presentes (“x”) e majoritários (“xx”), em relação a intensidade de picos detectadas nas amostras. Os compostos mais intensos foram 3-Methyl-1-butanol e 2-Methyl-1-butanol, encontrados nas emissões de macerado de maracujá. É importante esclarecer que a intensidade dos picos no cromatograma em uma análise por SPME depende da concentração do composto na amostra, do tipo de fibra utilizada, do ponto de ebulição do composto e das condições de extração. As moléculas 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol, 1-Hexanol, Cymene / Cymol, Limonene, Isopulegol e Citronellal, foram encontradas nas emissões de ambas espécies (*N. officinale* e *P. edulis*) (Tabela 2).

#### Tabela 2

Compostos orgânicos voláteis identificados nos macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá através da cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas.

	Composto	RI Exp. <sup>†</sup>	RI Lit. <sup>‡</sup>	Similar. (%) <sup>§</sup>	Folhas de agrião	Sementes de maracujá
1	3-Methylfuran	611	611	93,7	x	-
2	2-Methyl-1-propanol	628	622	94,5	x	-
3	Trichloroethane	635	642	95,1	-	x
4	3-Methylbutan-1-al	655	654	90,1	-	x
5	2-Methyl-1-butanal	670	664	91,1	-	x
6	1-Penten-3-ol	685	686	89,7	x	-
7	3-Pentanone	698	701	95,7	x	-
8	3-Methyl-1-butanol	735	734	89,3	x	xx
9	2-Methyl-1-butanol	736	738	89,3	x	xx
10	2,3-Butanediol	805	811	96	x	-
11	(E)-3-Hexen-1-ol	852	851	93,8	x	-
12	(Z)-3-Hexen-1-ol	857	857	94,9	x	-
13	1-Hexanol	871	867	91,7	x	x
14	3-Methyl-1-butyl acetate	875	876	92,6	x	-
15	Cymene/Cymol	1024	1022	95,1	x	x
16	Limonene	1029	1024	95,3	x	x
17	2-Ethylhexan-1-ol	1032	1029	93,6	x	-
18	1-Octanol	1076	1070	93,7	x	-
19	2-Nonanone	1093	1091	93,8	x	-
20	Linalol	1103	1095	91,8	x	-
21	Phenylethanol	1119	1110	94,6	x	-
22	Isopulegol	1151	1145	95,5	x	x
23	Citronellal	1153	1148	92,7	x	x
24	Unidentified	1160	-	-	-	x
25	Nonan-1-ol	1176	1171	95,5	x	-
26	$\alpha$ -Cyclocitral	1221	1218	90,3	x	-
27	Citronellol	1231	1228	95,3	x	x
28	Indole	1303	1304	94,2	x	-
29	2-Methoxy-4-vinylphenol	1315	1313	91,3	x	-
30	$\alpha$ -Ionone	1482	1485	96	x	-

x – composto minoritário; xx – compostos majoritários presentes nas amostras.

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

<sup>‡</sup> Índices de retenção de acordo com a literatura <sup>33, 34</sup>

<sup>§</sup> Similaridade entre o espectro de massas do pico e o espectro de massas da biblioteca

- Dados não disponíveis ou ausente na amostra

### 3.5. Atividade nematocida dos COVs encontrados nas emissões gasosas pelo GC-MS

Dentre os compostos investigados em relação à toxicidade, apenas o octanol, identificado nas emissões de folhas de agrião, causou mortalidade significativamente maior (1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), em relação aos demais tratamentos, causando 100% de mortalidade em comparação ao controle. As moléculas 2-Metil-1-propanol, 2-Etil-1-hexanol na concentração de 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , causaram mortalidade de 38% e 40%, respectivamente, em comparação ao controle ( $p < 0.05$ ). No entanto, Isopulegol e  $\alpha$ -Ionone não causaram mortalidade em  $J_2$  de *M. incognita* ( $p > 0.05$ ) (tabela 3).

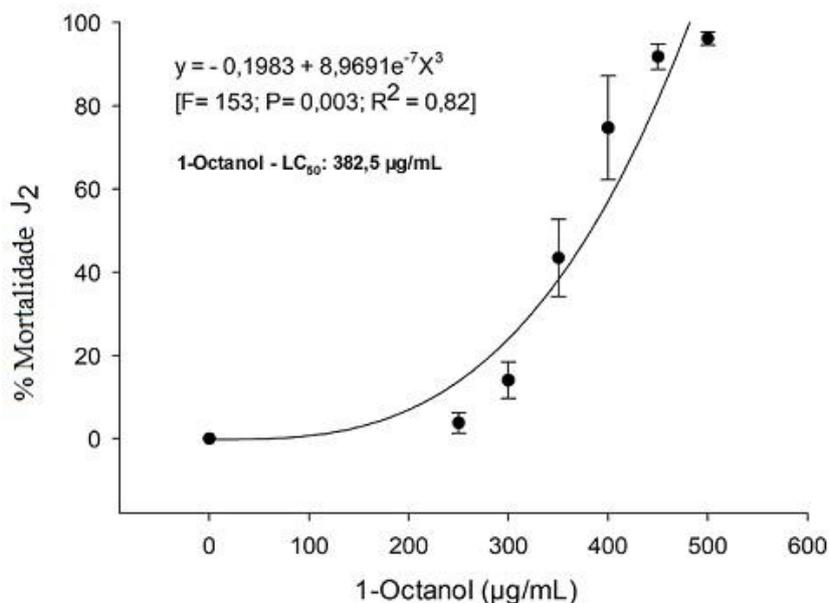
### Tabela 3

Porcentagem de mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após a exposição a Isopulegol, 2-Etil-1-hexanol,  $\alpha$ -Ionone, 2-Metil-1-propanol e 1-Octanol, nas concentrações de 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e Tween 80 (controle)

Composto ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	% Mortalidade $J_2$				
	Isopulegol	2-Ethyl-1-hexanol	$\alpha$ -Ionone	2-Methyl-1-propanol	1-Octanol
Tween 80	0 aA	0 bA	0 aA	0 bA	0 bA
500	1 aB	0 bB	0 aB	0 bB	99 aA
1000	5 aC	40 aB	5 aC	38 aB	100 aA

Letras maiúsculas diferentes na linha e letras minúsculas diferentes na coluna indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

O valor da  $CL_{50}$  (concentração letal média) para 1-Octanol foi de 382,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , atingindo mortalidade acima de 90% a partir de 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 5).



**Figura 5.** Mortalidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* após exposição a diferentes concentrações (µg/mL = microgramas/ mililitro) de 1-Octanol e valor da concentração letal para 50% (CL<sub>50</sub>) de J<sub>2</sub> de *M. incognita*. As barras indicam o erro padrão da média.

#### 4. DISCUSSÃO

A alta imobilidade, além da redução da infectividade e reprodução de *M. incognita* quando J<sub>2</sub> foram expostos aos COVs dos macerados de folhas de agrião e de sementes de maracujá (Fig. 1; Tabela 1), comprova a presença de moléculas tóxicas nos macerados. Toxicidade em macerados vegetais tem sido encontrado em várias espécies (BARROS et al., 2014a; AISSANI et al., 2015; JARDIM et al., 2017; LÓPEZ et al., 2017b; SILVA et al., 2018).

Embora não tenha ocorrido a mortalidade dos J<sub>2</sub>, a ocorrência da sua imobilidade foi suficiente para reduzir a infectividade e reprodução de *M. incognita*, quando J<sub>2</sub> são expostos aos COVs de agrião e maracujá e posteriormente inoculados em tomateiros. Este fato indica que na imobilidade alguns aspectos fisiológicos relevantes a infectividade e reprodução são deletariamente afetados. Acredita-se que os COVs atuam no sistema nervoso do nematoide, interferindo na capacidade dos J<sub>2</sub> em localizar o hospedeiro e/ou de formar sítios de alimentação (BARROS et al., 2014a). Resultados semelhantes foram observados através da redução da infectividade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* expostos aos COVs de mostarda (*Brassica juncea*) e nim (*Azadirachta indica*), indicando que os J<sub>2</sub> imovéis no teste *in vitro* sofreram dano irreversível na capacidade de infectividade (BARROS et al., 2014a).

A ausência de mortalidade dos J<sub>2</sub> neste trabalho pode estar ligada ao período curto de exposição deles aos COVs (24 h). Exposição de J<sub>2</sub> de *M. incognita*, por 72 h, aos COVs emitidos pelo fungo *Fusarium oxysporum* isolado 21 resultou em alta mortalidade (FREIRE et al., 2012), o que não ocorreu com exposição por 24 h (TERRA et al., 2017). Outra explicação para ausência de atividade nematicida é a concentração dos compostos nos macerados vegetais. Por exemplo, o composto 3-methyl-1-butyl acetate, na concentração de 100 µg/mL não apresenta atividade nematicida, entretanto, na concentração de 275 µg/mL causou 100% de mortalidade em J<sub>2</sub> de *M. incognita* (TERRA et al., 2018). Este composto está presente nas emissões do macerado de folha de agrião.

Somente os COVs do agrião tornaram a água tóxica aos J<sub>2</sub> de *M. incognita* a ela expostos (figura 2). Ao que tudo indica isto pode estar relacionado à maior abundância de moléculas voláteis no macerado de agrião (tabela 2). Os compostos 1-Penten-3-ol, 3-Pentanone, (E)-3-Hexen-1-ol, (Z)-3-Hexen-1-ol, Linalol, Phenylethanol, 2-Nonanone e 3-Methyl-1-butyl acetate identificados exclusivamente nas emissões do agrião apresentam atividade nematicida (CHITWOOD, 2002; GU et al., 2007; ECHEVERRIGARAY et al., 2009; BAI et al., 2011; BASSETO et al., 2012; MIAO et al., 2012; SILVA et al., 2013; AISSANI et al., 2015; XU et al., 2015; TERRA et al., 2018). Os compostos 3-Methyl-1-butyl acetate, 2-Nonanone e Phenylethanol foram identificados na água exposta aos COVs do fungo *Fusarium oxysporum* isolado 21 (TERRA et al., 2017). A maioria das moléculas identificadas no macerado de agrião pertence a classe de álcoois, sendo que há relatos de que a água exposta a voláteis de etanol causou 100% de mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* (SILVA et al., 2017). Os álcoois são moléculas solúveis em solventes polares devido as ligações de hidrogênio (MARTINS et al., 2013) A retenção de COVs na água está relacionada à solubilidade específica de cada molécula. Como a água é polar espera-se que compostos polares tenham maior solubilidade devido a interações intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio e interação dipolo-dipolo. Moléculas polares são retidas em maior quantidade (dissolvidas) na água que compostos aromáticos e alifáticos (RUIZ et al., 1998). A alta atividade nematicida da água exposta aos COVs do macerado de agrião (Figura 2) contrasta com a ausência de mortalidade (atividade nematicida) quando se expôs os J<sub>2</sub> diretamente aos COVs (Figura 1). Ao que tudo indica tal fato está ligado ao período maior de exposição dos J<sub>2</sub> à água que foi exposta aos COVs (48 h) comparada ao período menor de exposição aos COVs do macerado (24 h), onde foi comprovado que o maior período

de exposição de J<sub>2</sub> aos COVs (72 h) causa mortalidade em J<sub>2</sub> (FREIRE et al., 2012; SILVA et al., 2018).

A biofumigação utilizando ambas espécies vegetais reduziu o número de galhas e de ovos de *M. incognita* em tomateiro (Figura 3). Outros trabalhos tiveram resultados semelhantes quando incorporaram tecidos vegetais no solo para o controle de nematoides (LORD et al., 2011; BARROS et al., 2014b; LÓPEZ et al., 2014b). Na biofumigação provavelmente ocorreu um efeito sinérgico entre compostos voláteis e não voláteis reduzindo a viabilidade do nematoide, como observado por outros autores (PLOEG e STAPLETON, 2001; NEVES et al., 2007; WANG et al., 2009; SILVA et al., 2018). Espécies de brássicas, incluindo o agrião, produzem compostos sulfurados como o glucosinolatos, os quais são hidrolisados pela enzima mirosinase quando seus tecidos são danificados e incorporados ao solo, produzindo o composto isotiocianato (BONES et al., 2006; AIRES et al., 2009; OJAGHIAN et al., 2012; ZAHRADNÍKOVÁ e PETRÍKOVÁ, 2013) Os isotiocianatos possuem ação nematicida e fungicida (ZASADA e FERRIS, 2003; OJAGHIAN et al., 2012). No caso das sementes de maracujá, o efeito tóxico a fitonematoides, seja por moléculas voláteis e/ou não voláteis, não tinha sido relatado até o momento. Em função da eficiência da semente de maracujá para a biofumigação, novos estudos devem ser realizados buscando identificar as moléculas não voláteis com atividade tóxica aos nematoides.

A alta imobilidade dos J<sub>2</sub> expostos a emissões gasosas da mistura de macerado de folhas de agrião ou de sementes de maracujá durante a biofumigação indica que os vapores emitidos pelos macerados causam também toxicidade a *M. incognita*. Vapores emanados de outras incorporações vegetais em substrato ou solo causam toxicidade a fitonematoides (LORD et al., 2011; BARROS et al., 2014b; AISSANI et al., 2015; LÓPEZ et al., 2017b; SILVA et al., 2018).

A bioprospecção de moléculas com atividade nematicida entre os milhares de COVs produzidos por plantas e microrganismos pode resultar na descoberta de moléculas com potencial para serem desenvolvidas como produtos comerciais (CHITWOOD, 2002). No presente estudo, foram identificadas 26 moléculas voláteis no macerado de agrião e 12 moléculas no macerado de sementes de maracujá. A maioria das moléculas emitidas por agrião são álcoois e não houve a detecção de compostos sulfurados, como isotiocianatos. As moléculas 1-Penten-3-ol, 3-pentanone, 2-Methyl-1-butanol, 3-Methyl-1-butanol, (E)-

3-Hexen-1-ol, (Z)-3-Hexen-1-ol, 3-Methyl-1-butyl acetate, Cymene, Limonene, 2-Nonanone, Linalol, Phenylethanol, Citronellal e Citronellol, identificadas nos voláteis de folhas de agrião ou sementes de maracujá, apresentaram atividade nematicida em outros estudos (GU et al., 2007; ECHEVERRIGARAY et al., 2009; BAI et al., 2011; BASSETO et al., 2012; MIAO et al., 2012; MARTINS et al., 2013; SILVA et al., 2013; AISSANI et al., 2015; XU et al., 2015). Além disso, 3-methylfuran e 2,3-butanediol foram descritos por ser tóxico a outros fitopatógenos e por promover o crescimento de plantas, respectivamente (WILKINS et al., 2000; CORTES-BARCO et al., 2010).

O composto 1-Octanol, constatado nas emissões de macerado de folhas de agrião apresentou atividade nematicida, com  $LC_{50}$  382, 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , sendo que a  $LC_{50}$  do nematicida comercial carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methyl carbamate) é 191  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (TERRA et al., 2018). Contudo, o carbofuran apresenta maior toxicidade à humanos e ao ambiente, em comparação ao 1-Octanol (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, 2018; COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB, 2018). Este foi o primeiro trabalho a relatar a toxicidade de 1-Octanol a *M. incognita*. No entanto, nas emissões voláteis de *F. oxysporum*, isolado de massas de ovos de *Meloidogyne paranaenses*, também foi detectado 1-Octanol (LÓPEZ et al., 2017a). Apesar das outras moléculas, também encontradas nos macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá, não terem apresentado efeito tóxico direto, seu uso potencial não deve ser descartado, uma vez que, a mudança na quantidade e frequência de aplicação pode aumentar a sua eficiência. O estudo do efeito individual das moléculas das emissões sobre os nematoides e a identificação estrutural delas são importantes, pois algumas delas podem ser utilizados futuramente como substitutos de nematicidas altamente tóxicos (HELLER et al., 2010; SASANELLI et al., 2014).

Os resultados aqui apresentados indicam que a biofumigação com macerados de folha de agrião seguida de irrigação poderá constituir em uma alternativa viável no manejo de fitonematoides. A irrigação após a incorporação do material vegetal aumentaria a supressividade do solo, pois algumas moléculas voláteis com efeito tóxico a fitonematoides ficariam retidas na água e permaneceriam no solo por mais tempo, assim aumentando as chances de atingir o nematoide, que se movimenta pela água (WHEATLEY, 2002). Em regiões tropicais, uma alternativa, seria a combinação da biofumigação seguida da irrigação e pousio do solo (DUTRA e CAMPOS, 2003). A

umidade do solo e a temperatura estimulam a eclosão de J<sub>2</sub>, enquanto que a combinação dos COVs com a ausência de plantas levaria a intoxicação do J<sub>2</sub> e/ou perda da energia corporal e de sua capacidade de causar infecção (FREIRE et al., 2007).

No presente estudo, pela primeira vez, foi demonstrado os efeitos tóxicos a *M. incognita* dos COVs do macerado da folha fresca de agrião e da semente de maracujá. Sabe-se que as sementes de maracujá são resíduos da indústria alimentícia, que gera cerca de 54 mil toneladas de subprodutos descartados anualmente no Brasil (VARGAS et al., 2013; SANTOS et al., 2015). Portanto, a incorporação dessas sementes no solo seria uma alternativa viável para o controle de fitonematoides em pequenas áreas, como as utilizadas para olericultura.

## 5. CONCLUSÕES

Os compostos orgânicos voláteis de macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá são tóxicos a *M. incognita in vitro* e *in vivo*, e na biofumigação pelos vapores emitidos e no conjunto com compostos não voláteis em mistura no substrato. A água exposta ao macerado de agrião foi tóxica ao J<sub>2</sub> de *M. incognita*. As emissões voláteis de macerados de folhas de agrião e sementes de maracujá contém mistura complexa de compostos, respectivamente, 26 e 12 compostos. Ficou demonstrado que a molécula 1-Octanol é tóxica a *M. incognita* com LC<sub>50</sub> 382, 5 µg / mL.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, USA. 2007.
- AGUIAR, R. W de. S. et al. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and Citronellal against three fungal species. **The Scientific World Journal**, London, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- AIRES, A. et al. Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, with extracts of brassicacea plants. **American Journal Potato Research**, Moses Lake, v. 86, p. 327–333, 2009.

AISSANI, N. et al. Nematicidal activity of the volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.63, n.27, p. 6120-6125, 2015.

AMARAL, D. R. et al. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leida, v. 5, n. 6, p. 859–864, 2003. DOI: 10.1163/156854103773040763

ANVISA. 2017. Anvisa conclui reavaliação toxicológica do Carbofurano. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-conclui-reavaliacao-toxicologica-do-carbofurano/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-conclui-reavaliacao-toxicologica-do-carbofurano/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR)>. Acesso em: 20 Fev 2018.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990. DOI: 10.1021/ac00218a019

BAI, C. Q.; LIU, Z. L.; LIU, Q. Z. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium Ambrosioides* aerial parts. **E-Journal of Chemistry**, Campo Grande, v. 8, n. 1, p. 143-148, 2011. DOI: 10.1155/2011/470862

BARROS, A. F. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, Florenza, n.80, p.34–43, 2014a. DOI: 10.1016/j.apsoil.2014.02.011

BARROS, A. F. 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**, Flórida, v. 44, n. 2, p. 190-199, 2014b.

BASSETO, M. A. et al. Solarização em microcosmo: efeito de materiais vegetais na sobrevivência de fitopatógenos de solo e na produção de voláteis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, p. 123-130, 2012.

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T.; The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, Nantes, v. 67, p. 1053–1067, 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.02.024

CABONI, P. et al. Nematicidal activity of 2-thiophenecarboxaldehyde and methylisothiocyanate from caper (*Capparis spinosa*) against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 7345–7351, 2012.

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, p. 525-535, 2010

CETESB. 2018. Ficha de informação de produto químico. Disponível em: <[http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha\\_completa1.asp?consulta=OCTANOL](http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=OCTANOL)>. Acesso em: 12 Jan 2018.

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

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, 2002. DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045

CORTES-BARCO, A. M.; GOODWIN, P. H.; HSIANG, T. Comparison of induced resistance activated by benzothiadiazole, (2R,3R) - butanediol and an isoparaffin mixture against anthracnose of *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 59, p. 643-653, 2010.

CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlim, v. 9, p. 483–488, 2008.

DUTRA, M. R.; CAMPOS, V. P. Manejo do solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 608-614, 2003.

ECHEVERRIGARAY, S.; ZACARIA, J.; BELTRÃO, R. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leida, v. 100, n. 2, p. 199-203, 2010. DOI: 10.1094/PHYTO-100-2-0199

FREIRE, E. S. et al. Infectividade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após a privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 270-274, 2007.

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**, Sacramento, v. 44, p.321-328, 2012.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soi Biological and Biochemistry**, Leicestershire, v. 39, p. 2567-2575, 2007.

HELLER, J. J.; KORKMAZ, E.; CHARLES, P. Evaluation of the efficacy of DMDS using drip application for the control of root-kont nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Turkey. In: Gamliel, A., Coosemans, J. (eds). **VII International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate** Acta Hort., 2010.

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

JARDIM, I. N. et al. (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal Pest Science**, Innsbruck, v. 91, n. 1, p. 479-487, 2017.

KONG, J-O. et al. Nematicidal and propagation activities of thyme red and white oil compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: *Parasitaphelenchidae*). **Journal of Nematology**, Sacramento, v. 39, n. 3, p. 237–242, 2007.

LÓPEZ, L. E. 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**, Brasília, 2017a. DOI: 10.1007/s40858-017-0202-0

LÓPEZ, L. E. et al. Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 42, p. 443–450, 2017b. DOI: 10.1007/s40858-017-0154-4

LORD, J. S. 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 and Chemistry**, Easton, v. 59, p. 7882–7890, 2011. DOI: 10.1021/jf200925k

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A., ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000800026

MARTINS, M da. C. B.; SANTOS, C. D. G. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 135-142, 2016. DOI: 10.5935/1806-6690.20160016

MC CARTER, J.P. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematodes. In: Berg, R. H., Taylor, C. G. (eds). **Plant Cell Monographs: Cell Biology of Plant Nematode Parasitism**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 239–267, 2008.

MIAO, J. Q. et al. Antifungal and nematicidal activities of five volatile compounds against soil-borne pathogenic fungi and nematodes. **Acta Phytopathologica Sinica**, Durham, v. 6, p. 17, 2012.

NEERAJ, S. R. et al. Effect of plant extracts on hatching and mortality of root-knot nematode, *Meloidogyne Incognita* larvae (*in-vitro*). **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Skudai, v. 14, p. 467-471, 2017.

NEVES, W. S. et al. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 195-201, 2007.

NIST, 2013. NIST Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 30 Jul. 2017.

NICOL, J. M. et al. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (eds). **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. Springer, Dordrecht, 21-43, 2011. DOI: 10.1007/978-94-007-0434-3\_2.

OJAGHIAN, M. R. et al. *In vitro* biofumigation of brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology Journal**, Gangnam-gu, v. 28, n. 2, p. 185-190, 2012. DOI: 10.5423/PPJ-OA-11-2011-0206

PLOEG, A. T.; 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**, Leida, v. 3, p. 855-861, 2001.

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 and Technology**, Berkeley, v. 32, p. 1079–1084, 1998. DOI: 10.1021/es9704996.

SANTOS, B. H. et al. Dietary fibre and antioxidant compounds in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel and depectinised peel waste. **International Journal of Food Science and Technology**, Christchurch, v. 50, p. 268-274, 2015.

SASANELLI, N. et al. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Dimethyl Disulfide (DMDS) applied in drip irrigation on melon and tomato in apulia and basilicata (Italy). **Acta Horticulturae**, Bruxelas, v. 1044, p. 401-404, 2014. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1044.54

SERRA, B. et al. *In vitro* activity of 2-phenylethyl glucosinolate, and its hydrolysis derivatives on the root-knot nematode *Globodera rostochiensis* (Woll.). **Scientia Horticulturae**, Columbia Britânica, v. 92, n. 1, p. 75-81, 2002.

SILVA, J. C. P. et al. Plant volatiles reduce the viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* either directly or when retained in water. **Plant Disease**, Ames, 2018.

SILVA, J.C.P da. et al. Toxicity of ethanol solutions and vapours against *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leida, v. 19, n. 3, p. 271 – 280, 2017. DOI: 10.1163/15685411-00003046

SILVA, M. J. M. et al. Atividade antifúngica de óleos de sementes de frutas frente aos fungos *Cladosporium* e *Colletotrichum*. In: **Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**. org by Franco B, Landgraf M, Taniwaki M and Destro MT, São Paulo, 2014.

SILVA, W. R. J. et al. Volatile organic compounds for the control of *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, p. 375-386, 2013. DOI: 10.1590/S1982-56762013000500002

TERRA, W. C. et al. Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, College Station, v. 112, p. 34–40, 2017. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.06.004

TERRA, W. C. et al. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, Lincoln, v. 106, p. 125–131, 2018.

TRUDGILL, D. L.; BLOCK, V.C. Apomictic, polyphagous rootknot nematodes:exceptionally successfull and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Frankfurt, v. 39, p. 53–77, 2001.

VARGAS, J. H. L. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, Ontario, v. 51, p. 756–763, 2013.

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

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Bruxelles, v. 81, p. 357–364, 2002.

WILKINS, K.; LARSEN, K.; SIMKUS, M. Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. **Chemosphere**, Sydney, v. 41, p. 437-446, 2000. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00273-8

XU, Y-Y. et al. Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 12, p. 1415-1421, 2015.

ZAHRADNÍKOVÁ, H.; PETŘÍKOVÁ, K. Nematocid effects of watercress (*Nasturtium officinale* R. BR). **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, Brno, v. 61, n. 1, p. 233-236, 2013.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Nematology**, Leida, v. 93, n. 6, p. 747-750, 2003.