



LETÍCIA LOPES DE PAULA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona muricata*
NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

**LAVRAS – MG
2020**

LETÍCIA LOPES DE PAULA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona muricata* NO CONTROLE DE
*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 a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

LAVRAS – MG

2020

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

de Paula, Leticia Lopes.

Compostos orgânicos voláteis de *annonamuricatano*
controle de *Meloidogyne incognita* / Leticia Lopes de Paula. - 2020.
53 p.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Coorientador(a): Aline Ferreira Barros.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Graviola. 3. Compostos orgânicos
voláteis. I. Campos, Vicente Paulo. II. Barros, Aline Ferreira. III.
Título.

LETÍCIA LOPES DE PAULA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Annona muricata* NO CONTROLE DE
*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 a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de junho de 2020
Dr. Marcio Pozzobon Pedros DQI/ UFLA
Dra. Aline Ferreira Barros AGROTESTE
Dr. Willian César Terra DFP/ UFLA

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

LAVRAS - MG

2020

*Ao meu pai e minha mãe, por todo esforço e apoio durante esta longa jornada
às minhas irmãs, avó e ao namorado Vinicius por todo
apoio, carinho e amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por sempre me amparar e nunca me deixar desistir. Obrigada por sempre me guiar.

Aos meus pais André e Doralice pela educação, oportunidades, apoio, auxílio e amor, sem os quais eu não conseguiria cumprir o meu objetivo.

Às minhas irmãs Aline e Thaís, vocês também são uma peça essencial de minha vida.

Agradeço a minha avó Meire, por sempre estar ao meu lado, por ser a melhor madrinha do universo.

A meu namorado Vinicius, que sempre me amparou nos momentos difíceis, me acolheu e nunca me deixou desistir, e sempre me motivou para buscar ser melhor.

À Universidade Federal de Lavras por me proporcionar a realização de um sonho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação, compreensão, força e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia - DFP/UFLA, pelos ensinamentos.

A todos do laboratório de Nematologia, Willian, Aline Barros, Luma, Eduardo, Jeany, Paulo, Maysa, Flaminia, Pamella, Gustavo e Tarley, pela amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos, sem vocês nada disso seria possível.

Às minhas companheiras de residência, Ellen, Gabrielly e Danielle que sempre estiveram presentes.

Aos meus amigos, Juliana, Maysa, Paulo e Simone, por todos os jantares, lives e happy hour.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

Com o intuito de amenizar os efeitos negativos dos nematicidas atuais, torna-se importante o uso de alternativas para o manejo dos fitonematoides. Compostos produzidos por plantas fornecem perspectivas para o desenvolvimento de novos produtos, com menor toxidez ao homem e ambiente. No presente estudo nós investigamos a biofumigação do solo com macerado de folha de *Annona muricata* (graviola) contra *Meloidogyne incognita* e o efeito de seus compostos orgânicos voláteis (VOCs) sobre as diversas fases do ciclo de vida do nematoide. O macerado de folha de graviola apresentou atividade nematicida contra juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*. No processo de biofumigação, mesmo a menor concentração de macerado (1,0%), ocorreu redução na eclosão, infectividade e reprodução do nematoide. Através da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) foram identificadas 40 moléculas emitidas pelo macerado, das quais três (sabineno, óxido de cariofileno e 4-etilbenzaldeído) foram selecionadas para estudos de eficácia contra o nematoide. Apenas o 4-etilbenzaldeído apresentou atividade nematicida, com concentração letal (CL 50) de 35 µg/mL. A exposição dos J₂ a esta concentração resultou em redução de até 93% na infectividade e de até 96% na reprodução. Quando os J₂ foram expostos a CL₉₅ (88 µg/mL) não foi observado doença. Em teste *in vitro* 4-etilbenzaldeído na concentração de 150 µg/mL reduziu a eclosão de J₂ de *M. incognita* a valores similares ($P < 0,05$) ao nematicida comercial Nimitz na concentração de 200 µg/mL. Quando 4-etilbenzaldeído foi aplicado no solo na concentração de 1000 µg/mL o efeito foi similar ($P < 0,05$) ao nematicida Nimitz (250 µg/mL). Portanto, a molécula demonstra potencial para o desenvolvimento como nematicida comercial, com baixa toxicidade ao meio ambiente e alta eficácia no controle de fitonematoides.

Palavras Chaves: Graviola, biofumigação, prospecção de moléculas, controle alternativo.

ABSTRACT

In order to mitigate the negative effects of current nematicides, it is important to use alternatives for the management of phytophagous nematodes. Compounds selected by plants with prospects for developing new products, with less toxicity to man and the environment. In the present study, we investigated the biofumigation of soil with maceration of *Annona muricata* (graviola) leaf against unknown Meloidogyne and the effect of its volatile organic compounds (VOCs) on the different phases of the nematode life cycle. The macerate of the graviola leaf shows the nematicidal activity against the second stage (J2) of *M. incognita*. In the biofumigation process, even with the lowest concentration of macerate (1.0%), reduction in hatching, infectivity and nematode reproduction. Through gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC-MS), 40 molecules emitted by macerates were identified, of which three (sabinene, karyophyllene oxide and 4-ethylbenzaldehyde) were selected for evaluation studies against nematodes. Only 4-ethylbenzaldehyde had nematicidal activity, with a lethal concentration (CL 50) of 35 µg / mL. The exposure of J2 to this concentration resulting in a reduction of up to 93% in infection and up to 96% in reproduction. When J2 was exposed to a CL95 (88 µg / mL) it was not observed. In an in vitro test, 4-ethylbenzaldehyde at a concentration of 150 µg / mL reduces the outbreak of J2 of *M.*, with similar values ($P < 0.05$) and commercial nematicide Nimitz at a concentration of 200 µg / mL. When 4-ethylbenzaldehyde was applied to the soil, with a concentration of 1000 µg / mL, or the effect was similar ($P < 0.05$) to Nimitz (250 µg / mL). Therefore, a potential demonstrative molecule for the development of nematicidal companies, with low toxicity in the environment and high efficiency in the control of phytophagous nematodes.

Keywords: Soursop, biofumigation, molecule prospecting, alternative control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. incognita* após exposição por 48 h aos compostos orgânicos voláteis emitidos por diferentes quantidades de macerado de folha de graviola (média de 5 repetições). Barras representam o erro padrão da média. 31
- Figura 2.** Infectividade e reprodução de *Meloidogyne incognita* após expostos dos juvenis de segundo estágio (J2) por 48 h aos compostos orgânicos voláteis de macerados de folhas de graviola em diferentes concentrações. A) Galhas. grama⁻¹ de raiz; B) Ovos. grama⁻¹ de raiz⁻¹. Barras representam o erro padrão da média. 32
- Figura 3.** Número de galhas (A) e número de ovos (B) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro, resultantes da exposição de ovos de *M. incognita* no substrato nas diferentes doses de macerados de folha de graviola incorporadas ao substrato em copos e, posteriormente, fechados hermeticamente. As barras indicam o erro padrão da média. 32
- Figura 4.** Fórmulas químicas das moléculas selecionadas para prospecção. A – 4-etilbenzaldeído, B – Sabineno e C- Oxido de Cariofileno. 34
- Figura 5.** Número acumulado de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* eclodidos resultantes da exposição de ovos, por 48 horas, a diferentes doses de 4-etilbenzaldeído (50 e 150 µg/mL). Controle negativo: água, Tween 80. Controle positivo: Nimitz® (200 µg/mL). As barras indicam o erro padrão da média. Médias com a mesma letra não diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey. 37
- Figura 6.** Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro resultantes da aplicação de diversas concentrações da molécula 4-etilbenzaldeído (85 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL e 600 µg/mL) em substrato infestado com J2 de *M. incognita*. Controle positivo: Nimitz® (200 µg/mL) e controle negativo: água e Tween 80. Médias com a mesma letra não diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis identificados no macerado de folha de graviola pela SPME -GC-MS:.....	33
Tabela 2. Mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> , expostos por 48 h a diferentes concentrações das moléculas selecionadas.	35
Tabela 3. Concentração letal média (CL50) e (CL95) expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do composto 4-etilbenzaldeído e o nematicida comercial Nimitz® (ingrediente ativo Fluensulfona) sobre J2 de <i>Meloidogyne incognita</i> experimentos 1 e 2 e análise conjunta dos experimentos	35
Tabela 4. Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro inoculadas com juvenis de segundo estágio (J_2) de <i>Meloidogyne incognita</i> após a exposição a CL50 e CL95 do 4-etilbenzaldeído, por 48 horas. Controle positivo: água e Tween 80. Controle negativo: CL50 e CL95 do Nimitz®.	36
Tabela 5. Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro resultantes da fumigação de substrato com ovos de <i>M. incognita</i> em diferentes concentrações da molécula 4-etilbenzaldeído, controle positivo: Basamid ® (250 mg) e controle negativo: água.	38

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1 Os fitonematoides.....	15
2.2 Plantas úteis no controle de fitonematoides	16
2.3 Compostos voláteis produzidos por plantas	18
2.4 O gênero <i>Annona</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Obtenção do material vegetal.....	23
3.2 Obtenção de juvenis e ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	23
3.3 Efeito tóxico dos voláteis emitidos pelo macerado de folha de <i>Annona muricata</i> sobre juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	23
3.4 Infectividade de juvenis do segundo estágio de <i>M. incognita</i> após exposição aos voláteis emitidos pelo macerado de folha de <i>Annona muricata</i>	24
3.5 Biofumigação de substrato contendo ovos de <i>M. incognita</i> com macerado da folha de graviola.....	24
3.6 Caracterização dos compostos orgânicos voláteis.....	25
3.7 Atividade nematicida e CL50 e CL95 contra juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> de alguns compostos identificados nas emissões voláteis de folhas de graviola	26
3.8 Infectividade e reprodução de <i>M. incognita</i> em raízes de tomateiro após inoculação de juvenis de segundo estágio expostos por 48 horas a CL 50 e CL 95.....	27
3.9 Eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> após exposição de ovos ao composto 4-ethylbenzaldeido	28
3.10 Fumigação de substrato contendo ovos de <i>M. incognita</i> com as moléculas eficazes em teste <i>in vitro</i>	28
3.11 Aplicação do 4-etilbenzaldeido em substrato infestado com J2 de <i>M. incognita</i>	29
3.12 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Efeito tóxico dos voláteis emitidos pelo macerado de folha de <i>Annona muricata</i> sobre juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>	31

4.2 Infectividade de juvenis do segundo estágio de <i>M. incognita</i> após exposição aos voláteis emitidos pelo macerado de folha de <i>Annona muricata</i>	31
4.3 Biofumigação de substrato contendo ovos de <i>M. incognita</i> com macerado da folha de graviola	32
4.4 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis	33
4.5 Atividade nematicida e curva de concentração resposta CL50 e CL95 contra juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> de alguns compostos identificados nas emissões voláteis de folhas de graviola.....	34
4.6 Número de galhas e ovos de <i>M. incognita</i> em raízes de tomateiro após inoculação de juvenis de segundo estágio expostos por 48 horas a CL ₅₀ e CL ₉₅ do 4- etilbenzaldeido.....	35
4.7 Eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> após exposição de ovos ao composto 4-ethylbenzaldeido	36
4.8 Fumigação de substrato contendo ovos de <i>M. incognita</i> com as moléculas eficazes em teste <i>in vitro</i>	37
4.9 Aplicação do 4-etilbenzaldeido em substrato infestado com J2 de <i>M. incognita</i>	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

São diversos os prejuízos ocasionados pelos fitonematoides, a sua presença pode, inclusive, inviabilizar o plantio em áreas destinadas a culturas agrícolas. Mundialmente, estima-se que estes fitoparasitas são responsáveis por perdas de aproximadamente 160 bilhões de dólares anualmente, representando 14,6% da produção mundial de alimentos (NICOL, et al., 2011).

O controle dos fitonematoides é geralmente realizado através da aplicação de moléculas sintéticas caracterizadas como nematicidas, sendo que a maioria apresenta características químicas de alta toxicidade a microbiota do solo, aos seres humanos e outros organismos (SOUSA, et al. 2015). Devido a isso, diversos nematicidas estão sendo retirados do comércio, reduzindo assim, as opções de controle (NOLING, 2002). Alguns dos grupos químicos proibidos para comercialização incluem o brometo de metila e o metilcarbamato de oxima (é o grupo químico; aldicarb ingrediente ativo) (ANVISA, 2012; ANVISA, 2017). Para suprir a carência de produtos, compostos produzidos por plantas estão sendo isolados e estudados, obtendo-se resultados satisfatórios (CHITWOOD, 2002). Dentre eles estão as moléculas de pequenas cadeias de carbono (menos de 20 carbonos), denominadas de compostos orgânicos voláteis (COVs) que podem ser alternativas para o desenvolvimento de novos nematicidas, com menores impactos ao ambiente e menor efeito residual nos alimentos.

Estima-se que já foram identificados mais de 1700 COVs emitidos por espécies vegetais (KNUDSEN E GERSHENZON, 2006). Outra fonte importante de emissões voláteis são os microrganismos, principalmente, fungos e bactérias (ESTUPIÑAN-LÓPEZ et al., 2017; TERRA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Os compostos emitidos por extratos vegetais e exsudatos de raízes, atuam nas interações entre microrganismos (COSTA et al., 2001), contribuindo para o equilíbrio do microbioma do solo, atuando como antimicrobianos ou atrativos de inimigos naturais (DUDAREVA et al., 2006).

Na última década diversos estudos têm demonstrado a atividade nematicida de dezenas de COVs identificados em emissões de extratos vegetais e de microrganismos (BARROS et al., 2014a; PEDROSO et al., 2019; SILVA et al., 2019). No trabalho realizado por Pedroso et al. (2019), os COVs emitidos pela de torta de mamona se mostraram eficiente no controle de *M. incognita* em tomateiro. COVs emitidos por outros macerados vegetais como inflorescência de brócolis, semente de girassol, mostarda-castanha, nim, feijão-deporco, feijão-da-flórida, guandu, etc, também foram eficientes no controle de *M. incognita* (BARROS et al., 2014a; SILVA et al., 2019).

Além disso, as emissões dos resíduos e extratos vegetais, se identificados, podem servir para desenvolvimento de novas moléculas nematicidas. Para tanto, faz-se necessário estudos sobre a composição das emissões, seguido de testes biológicos com as moléculas. Um dos métodos utilizados na identificação de moléculas voláteis tóxicas a fitonematoides é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria em massa (GU et al., 2007). A partir dessa técnica, Pedroso, et. al (2019b), identificaram 32 compostos nas emissões de torta de mamona. Os compostos Escatol, γ -decalactona, 4-metil-fenol e fenol os quais apresentaram CL_{50} de 106,02 mg L⁻¹, 7,96 mg L⁻¹, 70,81 mg L⁻¹ e 18,68 mg L⁻¹, respectivamente, e foram inferiores ao nematicida comercial Carbofuran com CL_{50} 260 mg L⁻¹.

Annona muricata, conhecida popularmente por graviola, possui propriedades que são estudadas por diversas áreas de pesquisa. Esta planta apresenta diversos componentes químicos incluindo alcaloides, compostos fenólicos, terpenos, óleos essenciais, flavonoides, etc, além de ser rica em compostos acetogênicos (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). As folhas são utilizadas no mundo todo, por apresentarem propriedades fitoterápicas contra estresse oxidativo, diabetes, neuralgia, artrite, malária, inflamação, tumores e câncer, porém muitas delas sem comprovação científica. Além disso, diversos estudos comprovaram que a graviola possui efeito anti-helmíntico contra parasitas de pequenos ruminantes (FERREIRA, et al. 2013; FONSECA, et al. 2013; BUSTOS, et al. 2017). Atividades nematicidas e antifúngicas de acetogeninas isoladas de *Annonaceas* foram demonstradas, sendo consideradas fontes de moléculas para novos nematicidas e fungicidas botânicos (DANG et al., 2011). Contudo, estudos sobre o controle de fitonematoides utilizando *annonaceas* necessitam de mais detalhamento, principalmente com relação a emissão e identificação de compostos voláteis tóxicos a esses patógenos, bem como, o modo de ação das moléculas.

Desta forma, objetivou-se neste trabalho: I)- avaliar *in vitro* e em *in vivo* os efeitos tóxicos dos COVs emitidos por diferentes quantidades do macerado da folha de graviola em juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*; II)- Analisar o efeito da biofumigação com macerado da folha de graviola em substrato infestado com ovos de *M. incognita*; III)- Caracterizar as moléculas das emissões voláteis do macerado de folhas de graviola; IV)- Testar o efeito tóxico das moléculas encontradas nas emissões com picos mais intensos; V)- Calcular a concentração letal média (CL_{50}) e CL_{95} das moléculas que demonstraram toxicidade; VI)- Avaliar a infecção e reprodução de *M. incognita* expostos a CL_{50} e CL_{95} da molécula 4-etilbenzaldeído; VII)- Avaliar a eclosão de J2 de *M. incognita* após exposição de ovos ao composto 4-ethylbenzaldeído; VIII)- Analisar o efeito da fumigação do 4-ethylbenzaldeído em substrato infestado com ovos de *M. incognita*; IX)- Avaliar a infectividade

e reprodução de *M. incognita* após a aplicação de diferentes concentrações da molécula 4-etilbenzaldeído.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Os fitonematoides

Cerca de 7,5 bilhões de nematoides por hectare de solo podem ser obtidos da camada de 0-20 cm de profundidade. Dentre esses microrganismos, cerca de 4.000 espécies são capazes de hospedar plantas (DECRAEMER E HUNT, 2006). Os fitonematoides são responsáveis por uma redução de aproximadamente 14,6% na produção de alimentos no mundo (NICOL, et al., 2011). Estima-se que o prejuízo na produção agrícola possa chegar a aproximadamente 160 bilhões de dólares, anualmente (JONES et al., 2013). Além dos prejuízos diretos, os ferimentos ocasionados pela penetração dos fitonematoides podem servir de porta de entrada para outros patógenos, quebrando assim a resistência física da planta, tornando-a suscetível (MOLINARI, 2009).

Um dos sintomas característicos causados pelos fitonematoides é o amarelecimento das folhas, levando a incorreta diagnose de deficiência nutricional, ocasionando a aplicação desnecessária de fertilizantes ou defensivos agrícolas, que oneram os custos de produção sem haver acréscimo da produção (FERRAZ, BROWN, 2016).

São diversos os gêneros de fitonematoides, que ocasionam prejuízos as culturas, porém, o de maior gama de hospedeiros é o gênero *Meloidogyne* (JONES et al., 2013), conhecido como nematoides de galhas. Os sintomas característicos desse gênero são a presença de galhas nas raízes, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes na absorção e translocação de água e nutrientes, clorose e nanismo da planta, resultando no decréscimo direto da produtividade (SIKORA E FERNÁNDEZ, 2005). Dos danos causados por fitonematoides cerca de 70% são devidos ao gênero *Meloidogyne* spp. (SASSER E FRECKMAN, 1987). A principal espécie do gênero é *Meloidogyne incognita* (TRUDGILL e BLOK, 2001), que é responsável por ocasionar danos em aproximadamente 3.000 espécies vegetais (CASTAGNONE-SERENO, 2002).

O controle de fitonematoides na exploração agrícola comercial é essencial, podendo ser realizado de diversas formas, sendo a principal o controle químico. Esta tática possui diversas desvantagens, destacando-se os danos ocasionados ao meio ambiente, animais e ao homem. Tais problemas resultaram na proibição de diversas formulações, amplamente

utilizadas para o controle desses fitopatogenos, reduzindo por consequência as opções de controle (NOLING, 2002; ANVISA 2012; ANVISA 2017).

2.2 Plantas úteis no controle de fitonematoides

A preocupação com a sustentabilidade, fez com que a sociedade passasse a buscar novas alternativas de controle, com menos impactos ambientais, direcionando as pesquisas da área, para descoberta de moléculas e agentes biológicos com menores impactos no campo reduzindo assim o uso de formulados nocivos (CASTRO, 1989).

Surgem então os métodos de controle que visam a aplicação de extratos ou resíduos vegetais e animais envolvendo a biofumigação, fertilização verde além do uso de plantas que exsudam substancias no solo e reduzem a população de fitonematoides (CARBONI E NTALLI, 2014).

Grande parte das espécies presentes na flora brasileira não foram ainda estudadas quanto a toxicidade a fitonematoides, sendo possivelmente fonte para a descoberta de novos compostos químicos capazes de controlar o desenvolvimento desses fitopatógenos (STANGARLIN et al., 1999). Segundo Chitwood (2002), é possível obter diversos compostos com efeitos nematicidas a partir de plantas, o que justifica o uso de extratos de plantas para a adubação verde, biofumigação e prospecção de moléculas para o controle de fitonematoides.

Vários estudos tem sido realizados sobre a incorporação e utilização de plantas, extratos e seus resíduos no controle de fitonematoides. *Ricinus communis*, conhecida popularmente por mamona apresenta potencial na rotação de culturas e adubação verde, pois causa redução populacional de *Meloidogyne arenaria* (RITZINGER E MCSORLEY, 1998), além de sua torta apresentar efeito nematicida quando adicionada ao solo (AKHTAR E MAHMOOD, 1996; PEDROSO et al., 2019a). Pedroso, et al. (2019a), trabalhando com torta de mamona, demonstraram o efeito das emissões de COVs na imobilidade e mortalidade dos J₂ de *M. incognita*, identificaram as moléculas presentes nas emissões e realizaram estudos *in vivo* com as moléculas voláteis.

Diversos gêneros da família *Asteraceae* tem sido testadas no controle de fitonematoides (OKA, 2009), sendo o *Tagetes* o gênero mais estudado, tendo sido demonstrado seu efeito em rotação de culturas ou na incorporação ao solo para controle de nematoides dos gêneros *Pratylenchus* e *Meloidogyne* spp. Folhas de *Tagetes patula* quando incorporadas ao solo na presença de *Meloidogyne incognita* reduziram sua infecção em plantas hospedeiras susceptíveis (PLOEG, 2000). Outro gênero da família *Asteraceae* como

Artemisia e as espécies *A. verlotorum* e *A. absinthium*, mostraram atividades nematicidas contra *M. incognita* (DIAS et al., 2000; COSTA et al., 2003).

Crotalaria spp. são conhecidas pelo seu antagonismo a nematoides. Os seus exsudatos radiculares, contêm, substâncias químicas com ação nematicida ou nematostática (GOMMERS, 1981). Geralmente são utilizadas como planta de cobertura, rotação de culturas, seguida de incorporação ao solo e consorcio, pois possui efeito supressivo a nematoides, além de contribuir para o incremento de nitrogênio ao solo (WANG et al., 2002).

As *Brassica* spp., como por exemplo a mostarda, têm sido utilizadas intensamente no estudo sobre controle de fitonematoides. Henderson et al., (2009), constataram o efeito da incorporação da farinha de sementes de mostarda (*Brassica carinata*) na redução da população de *Meloidogyne chitwood* em campos de batata, além da redução de danos e aumento da produtividade. Barros et al., (2014b), estudaram macerado das folhas de mostarda crespa (*Brassica juncea*), em diversas concentrações, na mobilidade, mortalidade, reprodução e na biofumigação. Após 24 horas de exposição aos voláteis, constataram-se 100% de imobilidade e 91 a 100% de mortalidade. No teste de biofumigação ocorreu redução de galhas em 82,5%, quando comparados com a testemunha.

O nim (*Azadirachta indica*) é uma das plantas mais estudadas no controle de pragas e nematoides (BALDIN et al., 2012). Os efeitos nematicidas dos COVs emitidos pelo macerado da folha de nim foram comprovados com juvenis e ovos de *M. incognita* (BARROS et al., 2014b). Javed et al., (2007), demonstraram o efeito nematicida contra *Meloidogyne javanica* da da folhas de nim e do subproduto obtido após a extração do óleo da semente, conhecida como torta de nim, .

O efeito dos resíduos de colheita da pimenta no controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de tomateiro foi verificado através da redução do número de galhas em experimentos *in vivo*. Em casa de vegetação, os efeitos entre resíduos da colheita de pimenta, esterco e brometo de metila, foi significativo mesmo com ou sem cobertura de plástico, reduzindo o número de galhas (PIEDRA et al., 2007). Outros extratos aquosos foram testados contra *Meloidogyne javanica* por Gardiano et al., (2009), obtidos a partir de folhas de artemísia (*Chrysanthemum parthenium*), bardana (*Arctium lappa*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), carqueja (*Bacharis trimera*), cavalinha (*Equisetum* sp.), cinamomo (*Melia azedarach*), hortelã (*Mentha* sp.), mamona (*Ricinus communis*), manjerição (*Ocimum basilicum*), melão-de-São- Caetano (*Momordica charantia*), arruda (*Ruta graveolens*), Falso-boldo (*Coleus barbatus*), confrei (*Symphitum officinalis*), erva-de-bicho (*Polygonum acre*),

Feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), Funcho (*Foeniculum vulgare*), guiné (*Petiveria alliacea*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), mucunacinha (*Mucuna pruriens*) e nim (*Azadirachta indica*). Deles apenas os extratos de hortelã, bardana e mamona apresentaram resultados significativos na redução do número de galhas em 75,6%, 65,7% e 54,4%, respectivamente e no número de ovos em 81,7%, 75,9% e 56,6%, respectivamente.

Sementes de mamão (*Carica papaya*) demonstraram também efeito nematicida em *M. javanica* (NEVES et al., 2012) e *M. incognita* (GOMES et al., 2020). Neves et al., (2012), testaram o efeito da incorporação de diversas concentrações da farinha de semente de mamão em substrato infestado com *M. javanica*, em tomateiro, constataram uma redução significativa da população do nematoide em todos os tratamentos aplicados. Gomes et al., (2020), testaram o efeito do macerado de semente de mamão, em diversas concentrações na biofumigação de substrato contra ovos de *M. incognita*, sendo observado a redução no número de galhas e ovos a partir da concentração de 4%. O efeito nematicida de sementes de mamão tem comprovação do envolvimento de moléculas voláteis.

As plantas medicinais e aromáticas apresentam ação nematicida, através de metabólitos secundários, como os óleos essenciais e extratos vegetais (BARROS et al., 2019; MOREIRA et al., 2015). O extrato vegetal obtido da planta medicinal conhecida como erva de santa maria (*Dysphania ambrosioides*) aplicada como biofumigante de substrato infestado com *M. incognita* causou redução no número de galhas e ovos em todas as concentrações utilizadas, quando comparada a testemunha (SILVA et al., 2020).

2.3 Compostos voláteis produzidos por plantas

As substâncias orgânicas voláteis constituem-se de até 20 átomos de carbonos, com altas pressões de vapor. Podem atravessar membranas e serem liberadas na atmosfera e solo, na ausência de uma barreira de difusão. Muitas delas são liberadas por plantas sendo de difícil detecção (YUAN et al., 2009). Os COVs pertencem a diversos grupos químicos, sendo os de maior destaque e abrangência os hidrocarbonetos saturados, insaturados, e oxigenados, como os isoprenoides (isopreno e monoterpenos), bem como álcoois, ésteres, éteres e ácidos. (KESSELMEIER E STAUDT, 1999).

Diversos COVs estão presentes em plantas, representando cerca de 1% dos metabólitos secundários. As plantas produzem COVs como um método de comunicação e interação com o ambiente que as circundam. Mais de 1700 COVs têm sido isolados de 90 famílias de plantas, onde utiliza-se como fonte dos compostos, folhas, flores, frutos e raízes

(KNUDSEN E GERSHENZON, 2006). Tais compostos podem ter efeito nematicida, porém ainda são poucos os trabalhos com tal finalidade (DUDAREVA et al., 2006).

A biofumigação de solos e substratos se destaca no controle de fitopatógenos pela produção de compostos voláteis como aldeídos e isotiocianatos, que possuem atividade antimicrobiana incluindo toxicidade a fitonematoides (GARCÍA ÁLVAREZ et al., 2004). O grupo dos isotiocianatos é encontrado em plantas da família *Brassicaceae* que são utilizadas na biofumigação de solo em várias regiões do mundo (OKA, 2009). Em trabalhos com biofumigação de solo utilizando mostarda, constatou-se a presença de COVs sulfurados tóxicos a *M. incognita* (BARROS et al., 2014a).

O efeito de COVs tóxicos a nematoides torna-se possível em ambientes fechados principalmente *in vitro*. Desta forma avalia-se apenas a influência dos compostos liberados pela planta ou outros substratos e extratos em estudo. Na avaliação do efeito dos COVs das plantas, no trabalho realizado por Barros et. al (2014b), foram utilizados tubos SUPELCO e extrato aquoso e seco de nim e mostarda contra *M. incognita*. Os J2 expostos às emissões das espécies vegetais apresentaram alta imobilidade e baixa infectividade. Outras espécies vegetais e seus subprodutos, também demonstraram toxicidade a fitonematoides, adotando a mesma técnica descrita com o tubo SUPELCO (SILVA et al., 2019; PEDROSO et al., 2019).

Os COVS identificados através de análises cromatográficas podem ser testados na prospecção de novas moléculas contra patógenos, inclusive nematoides. No trabalho conduzido por Silva et al., (2019) os compostos dimethyldisulfide e dimethylsulfide, produzidos por inflorescência de brócolis, demonstraram atividade nematicida contra *M. incognita*.

Pedroso et al., (2019a), constataram 32 COVs através da cromatografia gasosa da torta de mamona. Desse total 4 (fenol, 4-methylfenol, γ -decalactone e escatole) foram selecionados para testes *in vitro* e *in vivo* contra *M. incognita*. Nos testes *in vitro* as quatro moléculas prospectadas demonstraram alto efeito de mortalidade contra os juvenis, apresentando CL₅₀ menor que o nematicida comercial utilizado como referência, sendo a CL₅₀ das moléculas: phenol 18,68 mg/L; 4-methylphenol 70,81 mg/L; γ -decalactone 7,96 mg/L; skatole 106,02 mg/L e a CL₅₀ do nematicida de referência (Carbofuran) de 260 mg/L. Nos testes *in vivo*, a maior quantidade utilizada (1000 μ L) das moléculas testadas, para fumigação de substrato, reduziram galhas e ovos (PEDROSO et al., 2019b).

As emissões de extrato da semente de mamão apresentaram na cromatográfica gasosa 17 COVs, sendo que desse total, 10 foram selecionados para testes *in vivo*, porém apenas 3 demonstraram mortalidade em baixa concentração (vinyl acetate, phenylacetaldehyde,

benzylacetoneitrile). As três moléculas selecionadas apresentaram CL_{50} menor que o nematocida comercial utilizado que foi o Carbofuran. Neste teste os valores de CL_{50} para cada molécula foi de: Phenylacetaldehyde $101,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, Vinyl acetate $61,59 \mu\text{g mL}^{-1}$, Benzylacetoneitrile $14,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para o Carbofuran de $164,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. No teste *in vitro* as moléculas Phenylacetaldehyde e Vinyl acetate apresentaram resultados semelhantes ao nematocida comercial, sendo estes considerados estatisticamente iguais (GOMES et al., 2020).

As análises por cromatografia gasosa dos extratos vegetais de *Cymbopogon nardus* e *Dysphania ambrosioides* relataram 52 COVs e três foram selecionados para testes *in vivo*. Nenhuma das moléculas testadas revelou efeito nematocida mesmo na maior dose utilizada que foi de $2000 \mu\text{g/mL}$ (SILVA et al., 2020). Muitas espécies de plantas ainda precisam ser investigadas com relação a presença de voláteis tóxicos a fitonematoides, criando oportunidades prospecção de novas moléculas para o uso no agronegócio.

2.4 O gênero *Annona*

A família Annonaceae, possui 75 gêneros e mais de 600 espécies. Porém, apenas os gêneros *Annona*, *Rollinia*, *Uvária* e *Asimina* produzem frutos comestíveis, sendo os dois primeiros os de maior importância comercial (CAÑIZARES ZAYAS, 1966). O gênero *Annona* possui 60 espécies das quais apenas a graviola (*A. muricata*), pinha (*A. squamosa*), condessa (*A. reticulata*), cherimóia (*A. cherimola*) e atemóia (*A. squamosa* x *A. cherimola*) possuem importância econômica. Este gênero se caracteriza pela produção de frutos compostos de sincarpis, sendo a graviola (*Annona muricata* L) e pinha (*A. squamosa*), as frutas mais importantes, economicamente, dentro deste gênero (SÃO-JOSÉ et al., 2000).

Os principais países produtores de *Annonaceae*s são México, Espanha, Brasil, Austrália, Venezuela, Chile, Peru e Filipinas (PINTO et al., 2005). Grande parte da produção brasileira de graviola é destinada a agroindústria, sendo comercializada como fruta fresca, polpa, suco ou processados (geleias). Os principais mercados consumidores do Brasil são as cidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Recife, Salvador, Fortaleza e Brasília (SÃO-JOSÉ et al., 2000).

As folhas, sementes e frutos de *Annona muricata*, popularmente conhecida por graviola, são utilizadas mundialmente em medicina fitoterápica. As folhas possuem propriedades terapêuticas, contra estresse, diabetes, neuralgia, artrite, malária, inflamação, tumores e câncer (FERREIRA et al., 2013; FONSECA et al., 2013; BUSTOS et al., 2017). Além dos usos relatados, a *A. muricata* é utilizada popularmente como anti-helmíntico,

antipirético, sedativo, antiespasmódico e anticonvulsivante em humanos. Devido ao crescente uso e impacto de *A. muricata* na saúde, países da América Latina, passaram a produzir e comercializar extratos de frutas e folhas (FERREIRA et al., 2013). As atividades biológicas dos extratos do gênero *Annona* foram relacionados à ocorrência de acetogeninas annonáceas, sendo esta uma classe de compostos naturais extraídos de folhas (GEUM-SOOG et al., 1998, WU et al., 1995) e sementes (CHANG E WU, 2001).

Diversas pesquisas realizadas com diferentes espécies do gênero *Annona* mostraram que extratos aquosos de *Annona senegalensis* (ALAWA et al., 2003, NDJONKA et al., 2011) e extratos de metanol e acetato de etila de *A. squamosa* apresentam atividade anti-helmíntica in vitro contra diferentes nematoides humanos, validando o potencial farmacológico do gênero (SOUZA et al., 2008; KAMARAJ E ABDUL RAHUMAN, 2011).

No caso específico da *A. muricata* (graviola) o extrato aquoso das folhas foi utilizado para testes contra nematoides de ovelhas, sendo os resultados promissores para uma possível formulação de fármacos a base do extrato (FERREIRA et al., 2013). Outros testes com o nematoide modelo *Caenorhabditis elegans* foram realizados. Bustos et al., (2017) utilizaram o extrato etílico da folha de graviola para testar o efeito na mobilidade e reprodução de um mutante de *Caenorhabditis elegans*, onde a locomoção foi prejudicada, possivelmente devido a neurotoxicidade do composto, e houve uma possível alteração da posição do ovo, impedindo a reprodução.

No controle de fitonematoides duas espécies do gênero *Annona* foram testadas, contra *Meloidogyne incognita* e *Bursaphelenchus xylophilus*. Dang et al. (2011), testaram compostos acetogênicos extraídos de sementes de *Annona squamosa*, contra *Meloidogyne incognita* e *Bursaphelenchus xylophilus* e dois fungos *Phytophthora infestans* e *Puccinia recondita*, demonstrando atividades nematicidas e antifúngicas. Os compostos bioativos, obtidos da *A. squamosa* como *esquococina*, *esquamocina-G* e *esquococina-H* demonstraram altas atividades contra *M. incognita* e *B. xylophilus*. Enfim os resultados sugeriram que as sementes de *A. squamosa* e seus compostos bioativos podem ser utilizados como nematicidas e fungicidas botânicos.

Nos experimentos realizados por Wiratno et al., (2009), foram testados 17 espécies de vegetais, sendo uma delas a *A. muricata*, contra *M. incognita*. Sementes das diferentes espécies foram secas, para obtenção do pó, que posteriormente foi diluído em álcool 96% e filtrado. Após um período de descanso, deste processo obtiveram-se os extratos que foram utilizados para os experimentos. Os resultados obtidos para o extrato da semente de graviola não foram significativos, a mortalidade foi de 4 a 5% e a CL_{50} maior que 19,2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

sendo então de baixa eficácia, quando comparado ao cravo (*Syzygium aromaticum L*), considerado o melhor tratamento, que apresentou mortalidade de 98% e CL_{50} de 3,9 ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

No entanto, testes não foram ainda conduzidos para se provar o envolvimento de moléculas voláteis presentes nos extratos de órgãos de *A. muricata* ocasionando toxicidade a fitonematoides.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

Folhas de *Annona muricata*, graviola, foram coletadas às 9 horas da manhã entre os meses de julho a março dos anos de 2019 e 2020. A árvore utilizada para a coleta está localizada no Departamento de Engenharia no campus da Universidade Federal de Lavras – Lavras / MG-Brasil (Latitude: -21.2457, Longitude: -44.9998 21° 14' 45" Sul, 44° 59' 59" Oeste). Somente folhas coletadas recentemente foram utilizadas para o preparo do macerado e obtenção das moléculas. A maceração foi realizada utilizando triturador manual de alho.

3.2 Obtenção de juvenis e ovos de *Meloidogyne incognita*

Juvenis de segundo estágio (J_2) e ovos de *M. incognita* utilizados nos experimentos foram obtidos de populações puras multiplicadas em plantas de tomateiro, cultivar Santa Clara[®] mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Nematologia - UFLA. Para verificar a pureza do inóculo utilizado, realizou-se a eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001). A suspensão de ovos de *M. incognita* foi obtida conforme a técnica de Hussey e Barker (1973). Assim, as raízes de tomateiro foram cuidadosamente lavadas em água parada para retirar partículas de substrato aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 0,5 a 1 cm e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5% por, aproximadamente, 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 “mesh”), acoplada à outra de 0,025 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos na última peneira. A suspensão de ovos foi incubada em câmara de eclosão a 28°C, obtendo-se então os J_2 . Apenas os J_2 eclodidos após 48 horas foram utilizados nos ensaios.

3.3 Efeito tóxico dos voláteis emitidos pelo macerado de folha de *Annona muricata* sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*

Para este ensaio utilizou-se a metodologia desenvolvida por Barros et al. (2014a). Para isso, folhas de graviola foram coletadas e esterilizadas superficialmente utilizando álcool 70%, durante 1 minuto, hipoclorito de sódio 2%, por 2 minutos e por fim água destilada esterilizada, por 2 minutos. Foram empregadas seis quantidades do macerado: 0g, 0,5g, 0,75g,

1,0g, 1,5g e 2,0g. As folhas foram maceradas utilizando um triturador de alho. A quantidade 0, foi considerada como testemunha. Tubos Supelco[®] foram preenchidos com 35g de areia autoclavada e, então adicionou-se na superfície o extrato vegetal nas quantidades pré-estabelecidas. A seguir, um microtubo de 1,5 mL foi enterrado até a metade na areia. Então, os tubos Supelco[®] foram vedados e incubados a 28 °C no escuro por 72h. Na sequência, com o auxílio de uma seringa, injetou-se um mL de uma suspensão aquosa contendo 200 J₂ de *M. incognita*, no interior do microtubo. Dessa forma, os J₂ foram expostos aos COVs liberados pelo macerado e retidos no interior dos tubos Supelco[®]. Os tubos Supelco[®] foram novamente incubados a 28 °C (± 2 °C) por 48 horas. Após este período, eles foram abertos e 100µL da suspensão de J₂ contida nos microtubos foram pipetadas para uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Foi estimado o número de J₂ móveis e imóveis, com o auxílio de microscópio de objetiva invertida. Para saber se os nematoides imóveis estavam mortos, pipetou-se 20 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 1.0 mol L⁻¹ (CHEN & DICKSON, 2000) Os J₂ que permaneceram imóveis, durante aproximadamente 3 minutos, foram classificados como mortos.

3.4 Infectividade de juvenis do segundo estágio de *M. incognita* após exposição aos voláteis emitidos pelo macerado de folha de *Annona muricata*

Para o ensaio de infectividade, uma suspensão aquosa contendo 600 J₂ foi exposta aos COVs emitidos pelo macerado da folha de graviola, conforme procedimento já descrito. Na testemunha foi utilizada água destilada e esterilizada em substituição ao material vegetal. Após o período de exposição aos COVs, a suspensão de J₂ foi dispersa em 4 mL de água e inoculada em mudas de tomateiro com 20 dias de idade, cultivar Santa-Clara, plantadas em copos plásticos de 300 mL contendo substrato multiplant[®]. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em casa de vegetação. O número de galhas e ovos por sistema radicular foi avaliado 45 dias após a inoculação.

3.5 Biofumigação de substrato contendo ovos de *M. incognita* com macerado da folha de graviola

Em copos plásticos de 300 mL, preenchido com 120 g de substrato multiplant[®], foi adicionado macerado de folha de graviola nas concentrações (g/g) de: 0 %, 1 %, 2 %, 4 % e 8 %. Como controle foi utilizado 20 mL de água destilada. Em seguida, foram dispersos 5 mL

de uma suspensão aquosa contendo 5000 ovos de *M. incognita*. O conteúdo de cada copo foi colocado em um saco plástico e agitado manualmente. Em cada copo ajustou-se a umidade para 60 % da capacidade de campo. A seguir, o copo foi vedado com filme plástico e mantido em casa de vegetação por 5 dias. Após este período, o filme plástico foi retirado e uma muda de tomateiro com aproximadamente, 20 dias, cultivar Santa-Clara, foi transplantada para cada copo. Aos 45 dias após o transplante, avaliou-se o número de galhas e ovos por sistema radicular.

3.6 Caracterização dos compostos orgânicos voláteis

Para a determinação das moléculas das emissões voláteis foi empregada a microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). Foram adotados os seguintes parâmetros: fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano); temperatura de extração de 55 °C e agitação da amostra a 250 rpm, tempo de extração de 35 minutos e tempo de dessorção no injetor do GC de 2 minutos. Para a separação e identificação dos COVs foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250 °C, da interface de 240 °C e da fonte de íons do detector de 200 °C. O injetor foi operado no modo splitless ou no modo split 1:4, de acordo com a intensidade dos picos nas amostras. Como gás de arraste foi utilizado He grau 5.0 a 1,0 ml min⁻¹. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40 °C até 160 °C a 3 °C min⁻¹ e então até 240 °C a 10 °C min⁻¹. O MS foi operado no modo de varredura na faixa de 40-350 v.µa. 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 entre os índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (NIST 2013; ROHLOFF AND BONES 2005). Para a comparação entre os espectros de massas foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%. Os índices de retenções experimentais foram obtidos através da injeção de uma série

homóloga de alcanos. A extração dos COVs foi realizada no macerado (1,5 g), de folhas de graviolas, após a formação de câmara de gas por 48 horas.

3.7 Atividade nematicida e CL₅₀ e CL₉₅ contra juvenis de segundo estágio de *M. incognita* de alguns compostos identificados nas emissões voláteis de folhas de graviola

A partir da identificação dos COVs por CG-MS, três moléculas que não possuíam estudos relacionados à toxicidade a *M. incognita* foram selecionadas para estudos de eficácia contra o nematoide. As três moléculas selecionadas foram: Sabineno, Oxido de Cariofileno e 4-ethylbenzaldeido. As moléculas foram testadas, inicialmente, nas concentrações de 250 µg mL⁻¹, 500 µg mL⁻¹ e 1000 µg mL⁻¹. Para tal, as moléculas foram diluídas em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g mL⁻¹, obtendo-se uma solução estoque de 500 µg mL⁻¹, 1000 µg mL⁻¹ e 2000 µg mL⁻¹. Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 500 µL das soluções estoques juntamente com 500 µL da suspensão de J2 contendo aproximadamente 200 J2, alcançando as concentrações finais desejadas (250 µg mL⁻¹, 500 µg mL⁻¹ e 1000 µg mL⁻¹). Após a adição dos J2, os microtubos foram vedados e incubados a 28° C por 48 horas. Passado esse período, os microtubos foram homogeneizados, abertos e 100 µL da suspensão foram transferidos para cavidade da placa de polipropileno com 96 cavidades, para posterior avaliação do número de J₂ móveis e imóveis calculando a mortalidade como já descrito. Como o 4-ethylbenzaldeido obteve efeito no controle do nematoide, foi realizada a curva de concentração resposta para determinar a sua dose letal a 50% dos J₂ de *M. incognita* (CL₅₀), bem como, a concentração letal para 95% dos J2 (CL₉₅). Para tanto, estabeleceu-se que as concentrações utilizadas para a curva de concentração seriam de: 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 µg mL⁻¹. Foram preparadas soluções estoques diluídas em solução aquosa de Tween 80[®] a 0,01 g mL⁻¹, obtendo-se as concentrações de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 µg/mL. A concentração 0 foi considerada como controle, utilizando-se apenas Tween 80. Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 500 µL das soluções estoques juntamente com 500 µL da suspensão de juvenis contendo aproximadamente 200 J2, obtendo-se as soluções finais desejadas (15, 30, 45, 60, 75 e 90 µg mL⁻¹). A seguir, os microtubos foram vedados e incubados a 28° C por 48 horas. Após esse período, os microtubos foram homogeneizados, abertos e 100 µL da suspensão foram transferidos para cavidades da placa de polipropileno com 96 cavidades, para avaliação da imobilidade e mortalidade como já descrito.

Como controle positivo, utilizou-se o nematicida comercial Nimitz[®] (5-chloro-2-(3,4,4-trifluorobut-3-en-1-ylsulfonyl)-1,3-thiazole). Para o cálculo de sua CL₅₀, tal utilizaram-

se as concentrações de 0, 25, 50, 75, 100 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram preparadas soluções estoques, com o dobro da concentração desejada, diluídas em Tween 80 a 0,01 g mL^{-1} . Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 500 μL das soluções estoques (produto comercial + Tween 80) juntamente com 500 μL da suspensão de nematoides contendo aproximadamente 200 J₂, obtendo-se as concentrações desejadas. Após a adição dos J₂ junto às diversas concentrações preparadas, os microtubos foram vedados e incubados a 28° C por 48 horas. A seguir, os microtubos foram homogeneizados, abertos e 100 μL da suspensão foram transferidos para cavidades da placa de polipropileno ELISA, para avaliações da imobilidade e mortalidade como já descrito.

3.8 Infectividade e reprodução de *M. incognita* em raízes de tomateiro após inoculação de juvenis de segundo estágio expostos por 48 horas a CL 50 e CL 95.

Para este ensaio, foram utilizadas as concentrações letais médias a 50% (CL₅₀) dos J₂ e 95% (CL 95) de 4-ethylbenzaldeído obtidas através do experimento anterior. Como testemunhas negativas utilizou-se a solução de Tween 80 e água, e como controle positivo foram utilizadas a CL 50 e CL 95 do nematicida comercial Nimitz®. Para tal prepararam-se as soluções estoques com o dobro da concentração final desejada, diluídas em Tween 80 a 0,01 g/mL como já descritas. Em microtubos de 2 mL foram adicionados 1000 μL de uma suspensão contendo 600 J₂ e 1000 μL da solução estoque ou dos controles. Os microtubos foram vedados e incubados a 28°C por 48 horas. A seguir, os tubos foram homogeneizados e abertos, sendo retirado de cada um uma alíquota de 100 μL , que foi transferido para uma cavidade da placa de polipropileno ELISA a fim de calcular a imobilidade e mortalidade como descrito. Esta estimativa foi realizada para comprovar a mortalidade observada no ensaio anterior, antes da inoculação dos J₂ em tomateiros. A suspensão restante nos microtubos, contendo aproximadamente 540 J₂, foi dispersa em 2 mL de água destilada, seguida de inoculação de, aproximadamente, 4 mL em cada muda de tomateiro com 20 dias de idade, cultivar Santa-Clara, transplantadas em copos plásticos com capacidade de 300 mL com substrato multiplant®. Após a inoculação, os copos com as mudas foram mantidos em casa de vegetação. Os números de galhas e de ovos por sistema radicular foram avaliados 45 dias após a inoculação.

3.9 Eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* após exposição de ovos ao composto 4-ethylbenzaldeido

O experimento foi conduzido em placas de Petri de polipropileno, de 5,5 cm, onde colocou-se uma peneira de PVC contendo uma malha de 0,025 mm (500 mesh), para retenção dos ovos. O composto 4-ethylbenzaldeido foi diluído em Tween 80 a 0,01 g/mL, obtendo soluções com concentrações de 50 e 150 µg/mL. Como controle positivo utilizou-se Nimitiz[®] a 200 µg/mL e negativo Tween 80 a 0,01 g/mL e água. Em cada placa foram pipetados 10 mL das soluções da molécula nematicida ou do controle. A seguir, colocou-se a peneira e no seu interior foram adicionadas 50 µL de uma suspensão aquosa contendo, aproximadamente, 5000 ovos. Posteriormente, as placas foram fechadas e vedadas com filme plástico e incubadas a 28° C durante 48 horas. Após este período, a peneira foi retirada e o líquido recolhido para realizar a contagem do número de J2 eclodidos. Os ovos contidos nas peneiras foram submetidos a uma lavagem, a fim de se retirar o excesso de solução. A seguir, os ovos de cada tratamento foram colocados em peneiras de PVC (500 mesh) e adicionada 10.000 µL de água. As placas foram fechadas e incubadas por 48 horas a 28°C. Seguiu-se então a avaliação da eclosão. Nova lavagem e avaliação a eclosão foi feita a cada 48 horas, sendo então obtidos 5 contagens no período de 10 dias.

3.10 Fumigação de substrato contendo ovos de *M. incognita* com as moléculas eficazes em teste *in vitro*

Para este ensaio foram utilizadas garrafas de polietileno tereftalato (PET) de 2 L preenchidas com 1,5 L de substrato multiplant[®]. Cada garrafa recebeu 5 mL de uma suspensão contendo aproximadamente 15.000 de ovos de *M. incognita*. As concentrações utilizadas de 4-ethylbenzaldeido foram 200, 500 e 1000 µL por litro de substrato. Como controle positivo utilizou-se o fumigante comercial nematicida Basamid[®] (3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione (DAZOMETE) a 0,25 mg/L de substrato e como controle negativo água. A umidade do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de campo. Todas as garrafas foram fechadas com tampa e vedadas com filme plástico. A mistura foi homogeneizada e permaneceram a 28°C por três dias. Cada garrafa foi então aberta e o substrato foi revolvido e deixado em repouso por cinco dias quando foi vertido em copos plásticos. Uma muda de tomateiro, com aproximadamente, 20 dias de idade, cultivar Santa-

Clara, foi transplantada em cada copo. Após 45 dias foram avaliados os números de galhas e de ovos por sistema radicular.

3.11 Aplicação do 4-etilbenzaldeído em substrato infestado com J2 de *M. incognita*

Para este ensaio, foram utilizadas as concentrações de $85 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 4-etilbenzaldeído. Como testemunhas negativas utilizou-se a solução de Tween 80 e água, e como controle positivo utilizou-se a concentração de $200 \mu\text{L mL}^{-1}$ do produto Nimitz®. Para tal foram preparadas as soluções da molécula e do nematicida Nimitz®, diluindo-as em Tween 80 a $0,01 \text{ g/mL}$, a fim de se obter as concentrações desejadas. Mudanças de tomateiro com aproximadamente 20 dias, cultivar Santa-Clara, foram transplantadas em copos plásticos de 300 mL contendo substrato multiplant®. Posteriormente 4 mL de uma suspensão contendo aproximadamente 600 J₂, foi igualmente distribuída entre quatro buracos próximos ao sistema radicular do tomateiro. Cerca de 4 mL de cada concentração de molécula foram aplicados logo após a inoculação dos J₂. A seguir os buracos foram preenchidos com o mesmo substrato e os copos foram mantidos em casa de vegetação. O número de galhas e de ovos por sistema radicular foram avaliados 45 dias após a inoculação.

3.12 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

Todos os ensaios foram realizados duas vezes, em delineamento inteiramente casualizados, com 5 repetições para cada tratamento. Os experimentos foram submetidos a análise combinada a fim de verificar se havia diferença significativa entre eles. Os ensaios: “Efeito tóxico dos voláteis emitidos pelo macerado de folha de *Annona muricata* sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*”, “Curva de concentração resposta da CL₅₀ e CL₉₅ contra juvenis de segundo estágio de *M. incognita*”, “Eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* após exposição de ovos ao composto 4-etilbenzaldeído” e “Aplicação do 4-etilbenzaldeído em substrato infestado com J2 de *M. incognita*” foram analisados de forma conjunta, não sendo observada diferença significativa entre os experimentos ($P > 0,05$), considerando-se 10 repetições por tratamento. Devido a semelhança, do experimento de curva de concentração, as análises no Probit foram realizadas com a média dos dois experimentos, constando 10 repetições no total. Os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Barlett). No caso dos dados que não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, estes foram submetidos à

transformação. Os dados do ensaio “Infectividade de juvenis do segundo estágio de *M. incognita* após exposição aos voláteis emitidos pelo macerado de folha de *Annona muricata*” relativos ao número de galhas e ovos foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$. Os dados obtidos no experimento de biofumigação de substrato com macerado da folha de graviola, foram transformados de duas formas, sendo que para o número de galhas utilizou-se $\sqrt{(x)}$ e para ovos utilizou-se $\log(x)$. Os dados obtidos no experimento “Infectividade e reprodução de *M. incognita* em raízes de tomateiro após inoculação de juvenis de segundo estágio expostos por 48 horas a CL 50 e CL 95” os dados referentes a galhas (experimento 1), galhas e ovos (experimento 2) foram transformados para $\log(x+1)$, e os dados de ovos (experimento 1) $\sqrt{(x+1)}$. Os dados do experimento “Eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* após exposição de ovos ao composto 4-ethylbenzaldeido” foram transformados para $\sqrt{(x)}$. Os dados de galhas e ovos (experimento 1) obtidos no experimento de “Fumigação de substrato contendo ovos de *M. incognita* com as moléculas eficazes em teste *in vitro*” foram transformados para $\log(x+1)$, e os dados de galhas e ovos (experimento 2) foram transformados para $\sqrt{(x)}$. Os dados de ovos referentes ao experimento “Aplicação do 4-ethylbenzaldeido em substrato infestado com J2 de *M. incognita*” foram transformados para $\log(x+1)$. Para o teste de médias do experimento de eclosão, foi considerado o somatório de todos os dias avaliados, sendo realizada o teste de médias apenas para o dia 10. Atendido os pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da análise de variância. Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$), as médias referentes aos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para as variáveis quantitativas realizou-se análise de regressão, utilizando-se modelos de regressão lineares e não lineares.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito tóxico dos voláteis emitidos pelo macerado de folha de *Annona muricata* sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*

Os COVs emitidos pelo macerado de folha de graviola causaram mortalidade nos J₂ de *M. incognita* (Figura 1), com o aumento da quantidade de macerado ocorreu aumento da mortalidade, chegando a 100% na maior quantidade (2,0 g). Desde a menor quantidade (0,5 g) ocorreu diferença significativa em relação ao controle (0 g).

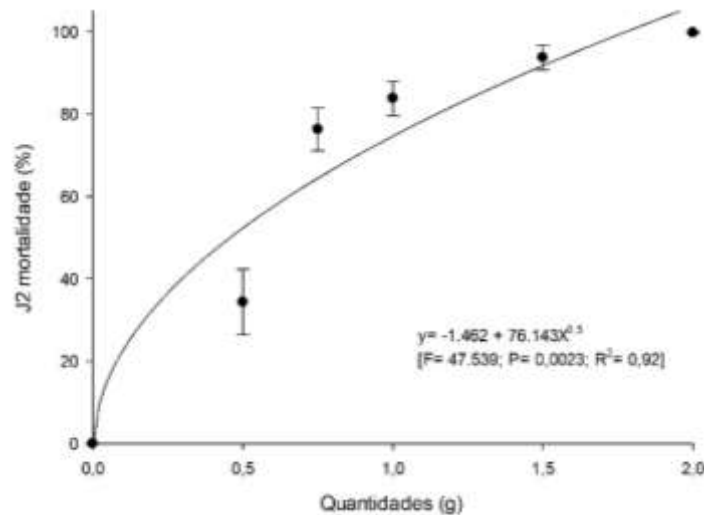


Figura 1. Mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. incognita* após exposição por 48 h aos compostos orgânicos voláteis emitidos por diferentes quantidades de macerado de folha de graviola (média de 5 repetições). Barras representam o erro padrão da média.

4.2 Infectividade de juvenis do segundo estágio de *M. incognita* após exposição aos voláteis emitidos pelo macerado de folha de *Annona muricata*

A infectividade dos J₂ de *M. incognita*, avaliada pelo número de galhas, e a reprodução pelo número de ovos, em raízes de tomateiro, decresceram com o aumento da quantidade de macerado utilizado e diferiram significativamente ($P < 0,05$) do controle (0 g)(Figura 2). A redução observada no número de galhas e ovos por grama de sistema radicular, comparando a maior quantidade utilizada com a testemunha negativa (água), foi de 85% e 95% no primeiro experimento e de 91% e 95% no segundo experimento, respectivamente.

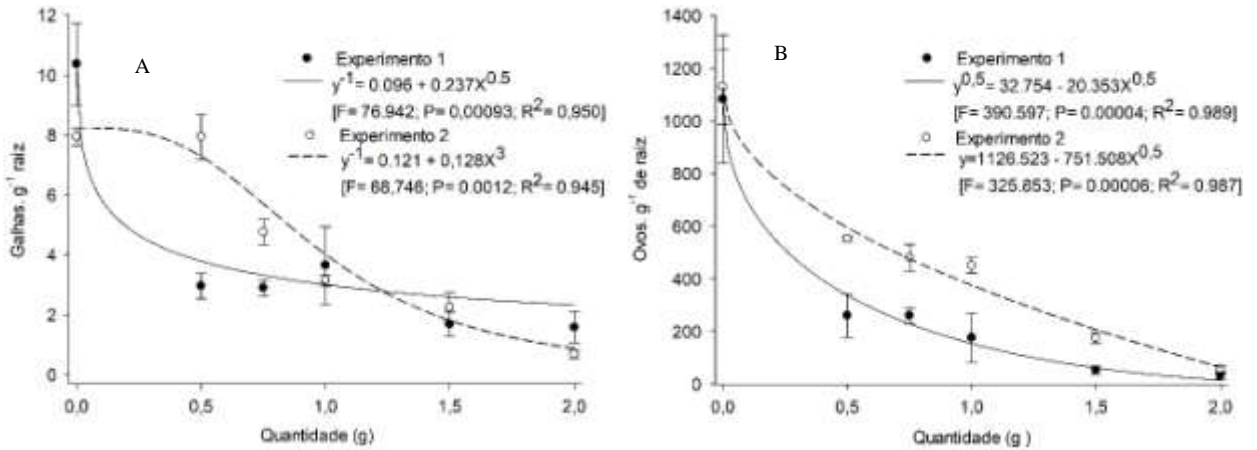


Figura 2. Infectividade e reprodução de *Meloidogyne incognita* após expostos dos juvenis de segundo estágio (J2) por 48 h aos compostos orgânicos voláteis de macerados de folhas de graviola em diferentes concentrações. A) Galhas. grama⁻¹ de raiz; B) Ovos. grama⁻¹ de raiz⁻¹. Barras representam o erro padrão da média.

4.3 Biofumigação de substrato contendo ovos de *M. incognita* com macerado da folha de graviola

O aumento da concentração do macerado reduziu significativamente ($P < 0,05$) a infectividade e a reprodução de *M. incognita* em raízes de tomateiro, (Figura 3). Na concentração de 8% do macerado incorporado ao substrato, o número de galhas e de ovos por grama de raiz foi reduzido em 79 % e 93 %, no primeiro experimento e 94% e 96% no segundo experimento, respectivamente, em relação a testemunha (concentração 0).

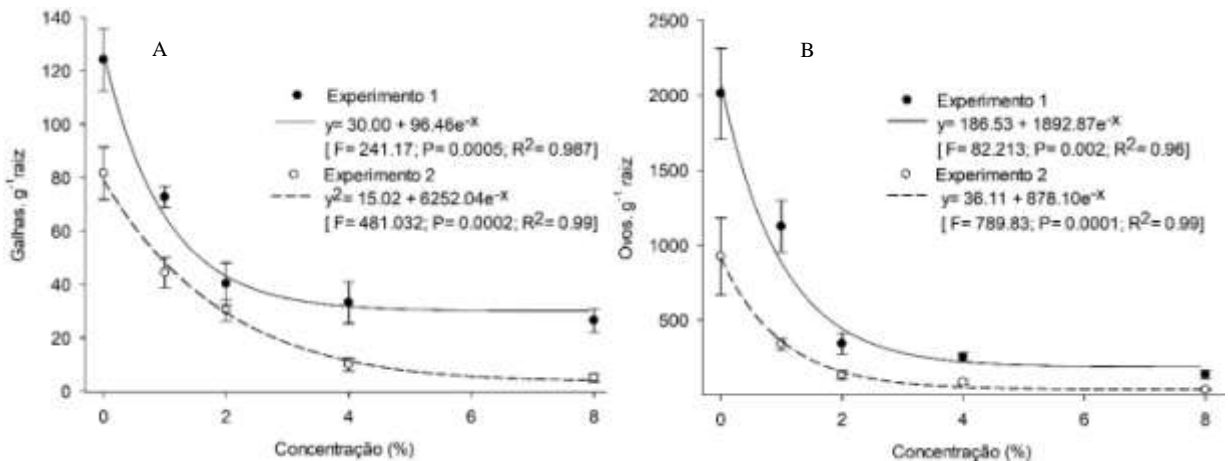


Figura 3. Número de galhas (A) e número de ovos (B) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro, resultantes da exposição de ovos de *M. incognita* no substrato nas diferentes doses de macerados de folha de graviola incorporadas ao substrato em copos e, posteriormente, fechados hermeticamente. As barras indicam o erro padrão da média.

4.4 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis

Foram encontradas 41 moléculas na emissão volátil do macerado de folha de graviola. Os compostos identificados nos macerados foram categorizados em baixa (“v”), mediana (“vv”) e alta (“vvvv”). Os compostos com intensidade mediana e alta foram: hexanal, 2-hexenal, hexanol, coapeno e E-cariofileno. Todos os demais 35 compostos foram identificados com baixa intensidade (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis identificados no macerado de folha de graviola pela SPME -GC-MS:

Composto	Grupo	RI Exp.	RI Lit. ^a	Graviola Folha
(1) etanol	Álcool	-	-	v
(2) 3-metil-butanol	Álcool	731,797	734	v
(3) 3-hexen-1-ol	Álcool	849,855	850	v
(4) hexanol	Álcool	866,377	863	vvv
(5) 3-metil-butanal	Aldeído	650,943	654	v
(6) hexanal	Aldeído	799,078	800	vv
(7) 2-hexenal	Aldeído	848,696	847	vv
(8) hexanql	Aldeído	866,377	863	vvv
(9) benzaldeído	Aldeído	957,143	952	v
(10) 2-etilhexenal	Aldeído	998,721	-	v
(11) 4-etilbenzaldeído	Aldeído	1160,47	1164	v
(12) 2-nonanone	Cetona	1090,49	1091	v
(13) acetato de etila	Éster	610,377	606	v
(14) hexanoato de etila	Éster	992,537	997	v
(15) octanoato de etila	Éster	1191,5	1195	v
(15) acetato de hexila	Éster	1007,08	1007	v
(17) α -pineno	Terpenos	929,424	932	v
(18) sabineno	Terpenos	966,738	969	v
(19) β -pineno	Terpenos	972,281	974	v
(20) mirceno	Terpenos	982,942	988	v
(21) terpineno	Terpenos	1009,07	1014	v
(22) limoneno	Terpenos	1026,11	1024	v
(23) trans- β -ocimeno	Terpenos	1042,92	1044	v
(24) γ -elemeno	Sesquiterpenos	1332,8	1335	v
(25) α -cubebeno	Sesquiterpenos	1347,84	1345	v
(26) longiciclono	Sesquiterpenos	1370,84	1371	v
(27) coapeno	Sesquiterpenos	1376,31	1374	vv

Continuação

Composto	Grupo	RI Exp.	RI Lit. ^a	Graviola Folha
(28) β -bourbureno	Sesquiterpenos	1385,42	1387	v
(29) β -elemeno	Sesquiterpenos	1391,12	1389	v
(30) E-cariofileno	Sesquiterpenos	1423,06	1417	vvv
(31) aromandreno	Sesquiterpenos	1441,51	1439	v
(32) E- β -farneseno	Sesquiterpenos	1454,37	1454	v
(33) α -Humuleno	Sesquiterpenos	1462,62	1452	v
(34) germacreno D	Sesquiterpenos	1489,08	1484	v
(35) β -selinene	Sesquiterpenos	1492,72	1489	v
(36) viridifloreno	Sesquiterpenos	1497,09	1496	v
(37) α -selinene	Sesquiterpenos	1501,25	1498	v
(38) γ -cadineno	Sesquiterpenos	1521,45	1516	v
(39) d-cadineno	Sesquiterpenos	1527,68	1522	v
(40) α -calacroleno	Sesquiterpenos	1544,64	1544	v
(41) óxido cariofileno	Sesquiterpenos	1586,53	1582	v

v—molécula presente; vv—molécula em maior pico no cromatograma.^a Índice de retenção teórico de acordo com a literatura (R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007.) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

4.5 Atividade nematicida e curva de concentração resposta CL50 e CL95 contra juvenis de segundo estágio de *M. incognita* de alguns compostos identificados nas emissões voláteis de folhas de graviola

Das 40 moléculas encontradas na cromatografia, 3 foram selecionadas para testes de eficiência nematicida, sendo elas, o Sabinene, Óxido de Cariofileno e 4-etilbenzaldeído. Apenas o composto 4-etilbenzaldeído (Figura 4) apresentou efeito nematicida *in vitro*, matando o J₂ de *M. incognita* nas três concentrações testadas (Tabela 2). As moléculas Sabinene e Óxido de Cariofileno não apresentaram efeito na mortalidade, em nenhuma das concentrações testadas, sendo estas excluídas dos testes posteriores.

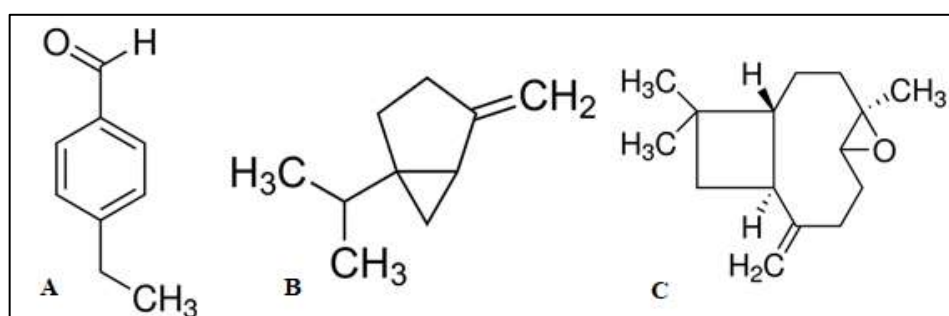


Figura 4. Fórmulas químicas das moléculas selecionadas para prospecção. A – 4-etilbenzaldeído, B – Sabinene e C- Óxido de Cariofileno.

Tabela 2. Mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, expostos por 48 h a diferentes concentrações das moléculas selecionadas.

Moléculas	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	Mortalidade (%)	
		Experimento 1	Experimento 2
Sabineno	1000	5%	0%
	500	0%	0%
	250	0%	0%
Oxido de Cariofileno	1000	5%	8%
	500	1%	2%
	250	0%	0%
4-etilbenzaldeído	1000	100%	100%
	500	100%	100%
	250	100%	100%

^a Concentração final, após a mistura da solução testada com a suspensão de J2.

Através da análise Probit, foram determinadas as CL_{50} e CL_{95} do 4-etilbenzaldeído e do nematicida comercial Nimitz[®]. O 4-etilbenzaldeído apresentou uma CL_{50} de $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CL_{95} de $88 \mu\text{g mL}^{-1}$, como valores bem inferiores aos encontrados para o nematicida comercial, que foi de CL_{50} de 85 e CL_{95} de 224 (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração letal média (CL_{50}) e (CL_{95}) expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do composto 4-etilbenzaldeído e o nematicida comercial Nimitz[®] (ingrediente ativo Fluensulfona) sobre J2 de *Meloidogyne incognita* experimentos 1 e 2 e análise conjunta dos experimentos

Moléculas	Experimento 1		Experimento 2		Análise conjunta dos experimentos	
	CL_{50}	CL_{95}	CL_{50}	CL_{95}	CL_{50}	CL_{95}
4-etilbenzaldeído	32	85	34	90	33	88
Nimitz [®]	85	225	84	223	85	224

4.6 Número de galhas e ovos de *M. incognita* em raízes de tomateiro após inoculação de juvenis de segundo estágio expostos por 48 horas a CL_{50} e CL_{95} do 4- etilbenzaldeído

A exposição dos J2 de *M. incognita* a CL_{50} e CL_{95} do composto 4-etilbenzaldeído por 48 h resultou em drástica redução do número de galhas (infectividade) e ovos (reprodução) de *M. incognita* em raízes de tomateiro. Quando os J2 foram expostos a CL_{95} não foi observado doença. (Tabela 4).

Tabela 4. Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro inoculadas com juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* após a exposição a CL₅₀ e CL₉₅ do 4-ethylbenzaldeído, por 48 horas. Controle positivo: água e Tween 80. Controle negativo: CL₅₀ e CL₉₅ do Nimitz®.

Tratamentos	Galhas/g raiz		Ovos/g raiz	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2
Água	40,98 e	34,49 d	425,40 c	2135,25 e
Tween 80	28,23 d	30,81 d	400,61c	1459,53 d
4-ethylbenzaldeído				
CL ₅₀	2,62 c	4,08 c	44,17 b	83,84 c
CL ₉₅	0 a	0 a	0 a	0 a
Nimitz®				
CL ₅₀	0,29 b	0,37 b	10,50 a	8,51 b
CL ₉₅	0 a	0 a	0 a	0a

Médias com a mesma letra não diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

A CL₅₀ da molécula 4-ethylbenzaldeído apresentou uma redução de 94% e 88% no número de galhas por grama de raiz, e de 90% e 96% no número de ovos por grama de raiz, para o primeiro e segundo experimento, respectivamente, em relação a testemunha (água). A CL₉₅ apresentou uma redução de 100%, tanto no número de galhas por grama de raiz quanto no número de ovos por grama de raiz, em ambos experimentos.

4.7 Eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* após exposição de ovos ao composto 4-ethylbenzaldeído

Ambas concentrações de 4-ethylbenzaldeído (50 e 150 µg mL⁻¹) reduziram significativamente (p<0,05) a eclosão de J₂ de *M. incognita* quando comparadas às testemunhas positivas/negativas, sendo que a maior concentração utilizada (150 µg mL⁻¹) não diferiu estatisticamente do nematicida comercial (Nimitz® 200 µg mL⁻¹) (Figura 4).

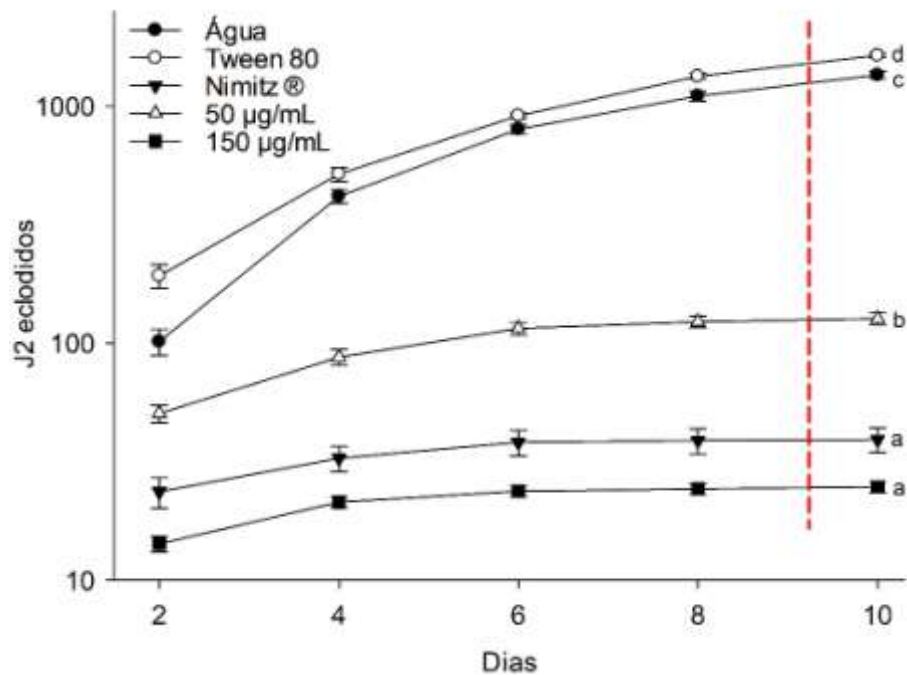


Figura 5. Número acumulado de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* eclodidos resultantes da exposição de ovos, por 48 horas, a diferentes doses de 4-ethylbenzaldeído (50 e 150 µg/mL). Controle negativo: água, Tween 80. Controle positivo: Nimitz® (200 µg/mL). As barras indicam o erro padrão da média. Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A exposição dos ovos de *M. incognita* ao 4-ethylbenzaldeído na concentração de 150 µg mL⁻¹ reduziu a eclosão dos J2 em 99% quando comparado as testemunhas negativas (água e Tween 80). Na dose de 50 µg mL⁻¹ foi observado uma eclosão 55% superior, a do nematicida comercial Nimitz®. A concentração de 150 µg mL⁻¹, apresentou uma redução de 20% na eclosão de J₂ quando comparada ao controle positivo, no entanto, as mesmas não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$).

4.8 Fumigação de substrato contendo ovos de *M. incognita* com as moléculas eficazes em teste *in vitro*

A fumigação com 4-ethylbenzaldeído reduziu significativamente ($P < 0,05$) a infectividade e reprodução de *M. incognita*, em relação ao controle negativo, independentemente da concentração. (Tabela 5).

Tabela 5. Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro resultantes da fumigação de substrato com ovos de *M. incognita* em diferentes concentrações da molécula 4-etilbenzaldeído, controle positivo: Basamid® (250 mg) e controle negativo: água.

Tratamentos	Galhas/g raiz		Ovos/g raiz	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2
Água	20,34 d	22,07 d	577,58 d	718,54 d
Basamid® (250 mg)	0,11 a	0 a	0,31 a	0 a
4-etilbenzaldeído				
200 µL	5,70 c	5,21 c	74,90 c	76,22 c
500 µL	2,40 b	2,29 b	30,06 b	21,53 b
1000 µL	0,13 a	0 a	0,31 a	0 a

Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A redução no número de galhas/g raiz e ovos/g raiz em relação a testemunha negativa (água) quando utilizaram-se 200 µL da molécula foi de 76% e 90% para o primeiro experimento e de 72% e 87% para o segundo experimento, respectivamente. Quando utilizou-se 500 µL a redução de galhas/g raiz foi de 88% e 90% e do número de ovos/ g raiz de 95% e 97%, para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente. A maior quantidade, 1000 µL, causou efeito semelhante ($P < 0,05$) ao fumigante comercial Basamid®, . Quando comparada a testemunha negativa (água) a redução do número de galhas/ g raiz e ovos/g raiz foi de aproximadamente 100%, para ambos experimentos.

4.9 Aplicação do 4-etilbenzaldeído em substrato infestado com J2 de *M. incognita*

A aplicação de 4-etilbenzaldeído em solo infestado com J2 de *M. incognita* causou significativa ($P < 0,05$) redução na infectividade e a reprodução do nematoide, quando comparadas aos controles negativos água e Tween 80 independentemente da dose.

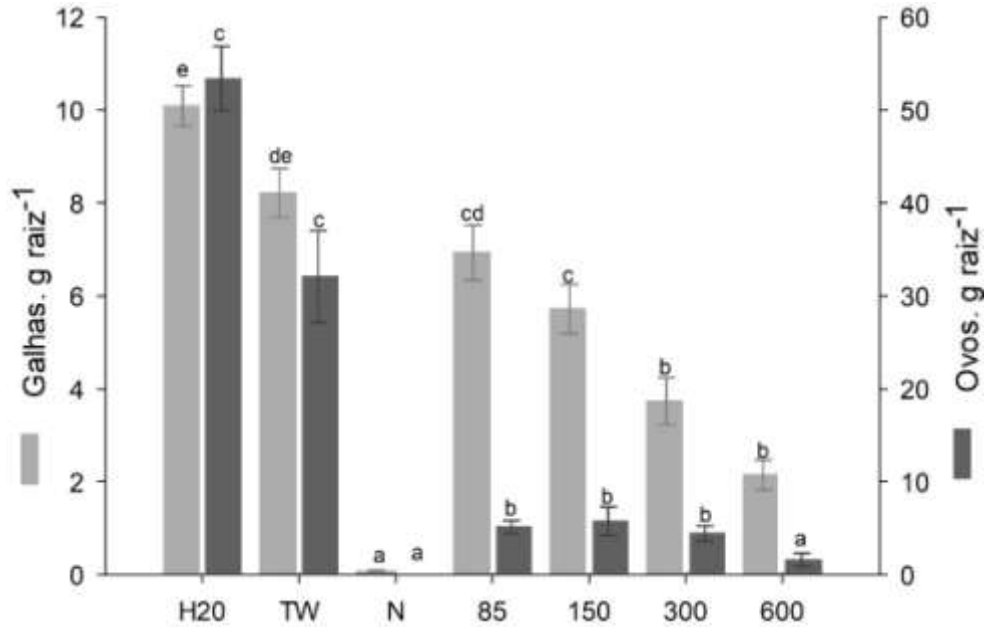


Figura 6. Número de galhas e ovos por grama de raízes de tomateiro resultantes da aplicação de diversas concentrações da molécula 4-etilbenzaldeído (85 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ e 600 $\mu\text{g/mL}$) em substrato infestado com J2 de *M. incognita*. Controle positivo: Nimitz[®] (200 $\mu\text{g/mL}$) e controle negativo: água e Tweem 80. Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A aplicação de 4-etilbenzaldeído nas concentrações de 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 300 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ causou redução no número de galhas/g raiz em relação a testemunha negativa (água) de 31%, 43%, 63% e 76 %, respectivamente. No número de ovos/ g raiz a redução, quando comparada a testemunha negativa (água), foi de 90% para 85 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$, de 92% para 300 $\mu\text{g/mL}$ e de 97% para 600 $\mu\text{g/mL}$. O número de ovos/ g raiz da concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) ao número observado para o controle positivo (Nimitz[®]).

5 DISCUSSÃO

O macerado obtido da folha de *Annona muricata* emite compostos orgânicos voláteis com alta toxicidade a *M. incognita*. Outros macerados provenientes de órgãos e subprodutos vegetais, também têm apresentado COVs tóxicos a nematoides (GOMES et al., 2020; SILVA et al., 2020a; SILVA et al., 2020b; BARROS et al., 2014a). O acréscimo na quantidade de macerado utilizado aumentou a ação dos voláteis contra os J2 de *M. incognita* (Figura 1), concordando com Silva et al. (2020), quando quantidades crescentes de *Dysphania ambrosioides* (erva-de-santa-maria), também aumentou a mortalidade de J₂ de *M. incognita*.

Acredita-se que o fato do número de galhas e ovos de *M. incognita* no sistema radicular do tomateiro, ter sido reduzido quando os J2 foram expostos aos COVs emitidos pelo macerado da folha de graviola, deve envolver a capacidade dos COVs de penetrarem na cutícula dos nematoides interferindo nas atividades suas enzimáticas, resultando na redução da penetração, estabelecimento de sítio de alimentação e conseqüentemente na reprodução, como também postulado por Barros et al. (2014b). De fato, o mesmo modo de ação deve envolver outros extratos vegetais, demonstrando efeitos semelhantes ao encontrado nesse trabalho (SILVA et al., 2020; GOMES et al. 2020; PEDROSO et al., 2019).

A biofumigação resultante da incorporação do macerado de folha de graviola ao substrato com ovos de *M. incognita*, em diversas concentrações, demonstrou que os voláteis e outras moléculas liberadas foram capazes de reduzir o número de galhas e ovos em plantas de tomateiro (Figura 3). Outros estudos com incorporação de extratos ou resíduos vegetais em solo ou substrato, comprovaram que o processo de biofumigação emite COVs tóxicos a fitonematoides (BARROS et al., 2014a; BARROS et al., 2014b; SILVA et al., 2020; GOMES et al. 2020; PEDROSO et al., 2019). A quantidade de macerado necessária para 1 ha considerando 10 cm de profundidade, seria de aproximadamente 32 toneladas, se considerada a maior concentração utilizada que foi de 8% (m/m). Desta forma estaria abaixo da quantidade recomendada para brássicas que é de 50 toneladas/ha, observando as propriedades biológicas e químicas do material utilizado (PLOEG, 2008).

Possivelmente, as reduções na eclosão e na infectividade dos juvenis ocorreram não apenas pelo efeito dos compostos voláteis liberados, mas aditivamente por outros compostos não voláteis liberados pelo macerado afetando talvez os eventos de desenvolvimento embrionário dentro do ovo. Compostos secundários, não voláteis, tem sido observados na família das *Annonaceae* como as acetogeninas (AAs), que são encontradas em todas os órgãos da planta, mas a maior concentração encontram-se nas folhas (LUNA, 2006). As AAs são

constituídas por uma longa cadeia de carbonos, conjugada por um anel γ -lactona terminal, sendo estas classificadas de acordo com o grupamento funcional em sua cadeia (ALALI et al., 1999). Tal composto possui efeito pesticida contra diversas larvas de moscas e mosquitos, ácaros e pulgões (HE et al., 1997; GUPTA et al., 2011; COSTA 2016). Dang et al. (2011) testaram o efeito de 10 AAs extraídas a partir da semente de *Annona squamosa*, contra *M. incognita*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Phytophthora infestans* e *Puccinia recôndita*. Dentre as utilizadas, três delas possuem efeitos melhores do que os controle químicos utilizados, sendo necessário uma menor concentração e tempo para ocasionar mortalidade.

Diversos compostos, de diferentes classes, foram encontrados nas emissões do macerado de folha de graviola (Tabela 1). As distintas classes de compostos como, terpenos, cetonas, álcoois, fenóis e ésteres, podem formar interações, resultando em complexas misturas, que exercem função de proteção, atração, adaptação ambiental e ação nematicida (MONTEIRO et al., 2014). Tal fato pode explicar a alta toxicidade do macerado da folha de graviola a *M. incognita*. Moléculas identificadas nas emissões do macerado de graviola como 3-metil-1-butanol, 2-hexenal, benzaldeído, mirceno, limoneno, 2-nonanone, tem o seu efeito tóxico testado contra nematelmintos (NTALLI et al., 2010; ECHEVERRIGARAY et al., 2010; KONG et al. 2007; ORTU et al., 2016; CHENG et al., 2017). No entanto, as moléculas presentes no macerado da graviola como: α -pineno, β -pineno, mirceno, não obtiveram efeito satisfatório no controle de fitonematoides (ECHEVERRIGARAY et al., 2010; NTALLI et al., 2010). As moléculas como: 4-etilbenzaldeído, aromandreno, α -humuleno, α -cralacroleno, não possuem ação nematicida comprovada. Aos nossos conhecimentos é o primeiro relato da ação nematicida do composto volátil 4-etilbenzaldeído, porém, os compostos sabineno e óxido de cariofileno não demonstraram efeito tóxico contra *M. incognita* (Tabela 2).

O 4-etilbenzaldeído é um composto orgânico, formado por um ácido benzoico, derivado do benzaldeído. Possui odor adocicado de amêndoas, com ocorrência natural em frango assado, bife grelhado, cidra, chá preto e amendoim torrado (BURDOCKO, 1996). Tal composto foi relatado em diversas análises de cromatografias gasosas oriundas de diferentes fontes como: ibuprofeno, cama aviária, ostras em diferentes dietas e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (CAVIGLIOLI et al., 2002; VAZ, 2018; PENNARUN et al, 2003; NICOLAU, 2014). Embora não existam relatos da utilização do 4-etilbenzaldeído no controle de fitonematoides ou outros fitopatógenos, a toxicidade do benzaldeído e oximas tem sido comprovada contra nematoides, insetos e outros fitopatógenos (JARDIM et al., 2017; BARROS et al., 2019; ULLAH et al., 2015).

Os valores obtidos da CL₅₀ e CL₉₅ para a molécula 4-etilbenzaldeído, foram de 33 µg/mL e 85 µg/mL; e de 85 µg/mL e 224 µg/mL para o Nimitz[®], respectivamente (Tabela 3). O análogo dele, o benzaldeído apresentou CL₅₀ de 171 µg/mL (JARDIM et al., 2017). No entanto, os valores encontrados para a molécula em estudo são inferiores aos estimados para os controles positivos e para o benzaldeído. Por meio de microscópio eletrônico de varredura, Caboni et al. (2013), observaram rompimentos na cutícula dos fitonematóides em contato com aldeídos, sendo este fato observado durante a avaliação deste trabalho, o que evidencia a toxicidade do 4-etilbenzaldeído a fitonematóides. A toxicidade de diferentes aldeídos a fitonematóides demonstraram a ocorrência da inibição da enzima V-ATPase, podendo esta, estar relacionada a nutrição, osmorregulação, síntese de cutícula e reprodução (CABONI et al., 2013). Portanto, mesmo que não haja morte do finematoide, possivelmente ocorrerá desregulação das funções vitais, alterando a sua capacidade de encontrar a planta, penetrar e estabelecer o sitio de alimentação.

Os ovos de fitonematóides constituem o principal meio de sobrevivência do patógeno no solo, sendo o seu controle de grande importância. O 4-etilbenzaldeído, além de ser tóxico aos J2 de *M. incognita*, demonstrou ter efeito na redução da eclosão, mesmo após a lavagem dos ovos (figura 5). Os poucos juvenis eclodidos possuíam o mesmo aspecto observado no experimento de curva de concentração (dados não demonstrados). Os resultados encontrados para a molécula na concentração 150 µg/mL não foram estatisticamente diferentes dos encontrados para o Nimitz[®] a 200 µg/mL (figura 5). A fluensufona, ingrediente ativo do controle positivo utilizado, possui efeito comprovado na redução de eclosão de fitonematóides (FEIST et al., 2020). Barros et al., (2019) demonstraram que o benzaldeído e a oxima do benzaldeído não foram capazes de controlar a eclosão. Portanto, provavelmente o análogo 4-etilbenzaldeído se comporta de forma diferente da observada para os demais análogos do benzaldeído, com diferente modo de ação.

Sabe-se que os nematicidas fumigantes são facilmente volatilizados em contato com o ar, liberando moléculas que deslocam facilmente no solo, possuindo amplo espectro de ação, alterando oxidases, proteínas e reagindo com diferentes aminoácidos (GALBIERI & BELOT, 2016). Geralmente são aplicados em sistemas fechados, para que os voláteis liberados não escapem para atmosfera, atuando no solo ou substrato, aumentando a sua eficácia como biocida (HAYDOCK et al., 2013). Realmente o 4-etilbenzaldeído demonstrou ter ação fumigante, pois reduziu a infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiro, em que a maior dose avaliada neste experimento (Tabela 5) apresentou comportamento semelhante ao controle positivo (Basamid[®]). Apesar de alguns compostos derivados de plantas apresentaram

fitotoxicidade (ROH et al., 2011), não foram observadas, em nenhuma das três quantidades utilizadas, alteração das características físicas da planta, indicando que a molécula talvez não seja fitotóxica. O 4-etilbenzaldeído possui características para ser utilizada na desinfecção de substrato para semeadura e transplante de mudas, após novas pesquisas.

Estudos realizados com prospecção de moléculas, tem demonstrado que os melhores efeitos tóxicos a fitonematoides provém das maiores concentrações estudadas (JARDIM et al., 2018; TERRA et al., 2018; PEDROSO et al., 2019). Neste trabalho, as maiores concentrações de 4-etilbenzaldeído utilizadas para investigar o efeito de eclosão (150 µg/mL) e na biofumigação (1000 µL) também tiveram os melhores resultados sendo estatisticamente iguais ao controle positivo utilizado. Resultados semelhantes foram constatados quando se testou (E) -cinnamaldeído, 4-methiphenol, fenol, γ -Decalactona, contra ovos de fitonematoides no processo de fumigação. Na mesma concentração (1000 µL), houve uma redução expressiva de galhas e ovos, superior as demais concentrações (JARDIM et al., 2018; PEDROSO et al., 2019).

Mesmo sendo uma molécula volátil, o 4-etilbenzaldeído, apresentou resultados satisfatórios quando aplicado em substrato infestado com J2 de *M. incognita*. No entanto, o análogo benzaldeído apresentou resultados *in vitro* contra fitonematoides, porém quando aplicado em substrato não apresentou diferença estatística da testemunha positiva para galhas. g raiz⁻¹ (BARROS et al., 2019). Tal fato pode estar relacionado com a instabilidade do benzaldeído em substrato, apresentando alta volatilidade e facilidade de ser convertido em ácido benzoico menos tóxico (BARROS et al., 2019). Tudo isso confirma as diferenças em modo de ação dos análogos do benzaldeído.

Portanto, não há dúvidas de que o macerado da folha de graviola possui voláteis tóxicos a nematoides, apresentando elevado potencial para uso no processo de biofumigação. Além disso, acredita-se que o 4-etilbenzaldeído poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos nematicidas, uma vez que este composto atua em diversas fases do ciclo de vida de *M. incognita*. Estudos mais aprofundados são necessários para conhecer melhor o seu modo de atuação e as viabilidades de uso em campo.

6 CONCLUSÃO

- Diferentes quantidades de macerado de folha de graviola apresentaram toxicidade a J₂ de *M. incognita* tanto *in vitro* quanto *in vivo*;
- A biofumigação de substrato infestado com ovos de *M. incognita* reduziu significativamente a infectividade e reprodução do fitonematoide em tomateiro;
- Foram encontradas 41 moléculas diferentes no extrato da folha de graviola;
- O 4-etilbenzaldeído encontrado nas emissões de extrato da folha de graviola apresentou alto efeito toxico a J₂, com baixa CL₅₀ e CL₉₅;
- Após a exposição dos J₂ a CL₅₀ e CL₉₅ houve uma redução significativa na infectividade e reprodução do *M. incognita*;
- O 4-ethylbenzaldeído reduziu a eclosão de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* após exposição de ovos ao composto;
- Em fumigação de substrato com ovos houveram reduções significativas da infectividade e reprodução;
- A infectividade e reprodução reduziu significativamente, após a aplicação de diferentes concentrações da molécula 4-etilbenzaldeído, em substrato infestado com J₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504–540, mar. 1999.
- ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ABDU, P.A, CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.M.; BOWMAN, D.D. In vitro screening of Nigerina medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v.113 p. 73-81. 2003.
- ANDRÉS, M.F.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SANZ, J.; BURILLO, J.; SAINZ, P. Nematicidal activity of essential oils: a review. **Phytochemical Review**, v.11, p.371-390. 2012.
- ANVISA. Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro. 2012. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/Nfh>. Acesso em: 29 set. 2019.
- ANVISA. 2017. Consulta pública nº 202 de 20 outubro de 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/359435>. Acesso em: 30 set. 2019.
- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, USA. v. 62, p.2145–2148. 1990.
- AKHTAR, M. AND MAHMOOD, I. Control of plant–parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**. v. 4, p. 243–247. 1996.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475. 2008.
- BALDIN, E.L.L; WILCKEN, S.R.S.; PANNUTI, L.E.R.; et al. Uso de extratos vegetais, manipueira e nematicida no controle do nematoide das galhas em cenoura. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 36-41. 2012.
- BARROS, A. F.; V. P. CAMPOS; J. C. P. SILVA; PEDROSO, M. P.; MEDEIROS, F. H. V.; POZZA, E. A.; REALE, A. L. 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**, v.80, p. 34-43. 2014a.
- BARROS, A. F., V. P. CAMPOS, J. C. P. SILVA, L. E. LÓPEZ, A. P. SILVA, A. POZZA, E. L. A. PEDROSO. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. **Nematropica** v.44, p. 190-199. 2014b.
- BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; PAULA, L. L.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, F. J.; TERRA, W. C.; SILVA, G. H.; SALIMENA, J. P. Nematicidal screening of essential oils and potent toxicity of *Dysphania ambrosioides* essential oil against *Meloidogyne incognita* in vitro and in vivo. **Journal of Phytopatology**, v. 167, p. 380-389. 2019.
- BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, F. J.; JARDIM, I. N.; COSTA, V. A.; MATRANGOLO, C. A. R.; RIBEIRO, R. C. F.; SILVA, G. H. Activities of essential

oils from three Brazilian plants and benzaldehyde analogues against *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 0, p.1-9. 2019.

BURDOCK, G. A. Encyclopedia of Food and Color Additives, v.1. CRC Press, Nova York, Estados Unidos. 1996.

BUSTOS, A.V. G. M.; JIMÉNEZ, M.G.; MORA R. S. The *Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 *Caenorhabditis elegans*. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 282-286. 2017.

CAMPOS, V.P. Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.). **Controle de Doenças de Plantas**. V. 1, Viçosa. 1997.

CABONI, P.; ASSANI, N.; CABRAS, T.; FALQUI, A.; MARROTA, R.; LIORI, B.; NTALLI, N.; SARAI, G.; SASANELLI, N.; TOCCO, G. Potent Nematicidal Activity of Phthalaldehyde, Salicylaldehyde, and Cinnamic Aldehyde against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1794-1803. 2013.

CABONI, P.; NTALLI, N. G. Botanical Nematicides, Recent Findings. **In Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities**. Washington, DC. p. 145–157. 2014.

CÑIZARES ZAYAS, J. Las frutas anonáceas. La Habana. **Ediciones Fruticus**, p.63. 1966.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, p. 35-34. 2001.

CASTAGONE-SERENO, P. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., and their ability to overcome plant resistance genes. **Nematologica**. v.4, p.605-608, 2002.

CASTRO, A. G. Defensivos agrícolas como um fator ecológico. Jaguariúma: EMBRAPA – CNPDA (documento, 6) 20 p. 1989.

CAVIGLIOLI, G.; VALERIA, P.; BRUNELLA, P.; SERGIO, C.; ATTILIA, A.; GAETANO, B. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 499-509. 2002.

CHANG, F.R.; WU. Y.C. Novel cytotoxic *annonaceus* acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.64, p. 925-931. 2001.

CHENG, W.; YANG, J.; NIE, Q.; HUANG, D.; YU, C.; ZHENG, L.; CAI, M.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; YU, Z.; ZHANG, J. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. **Scientific Reports**, v. 7. 2017.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Sept. 2002.

COSTA, M.J.N; CAMPOS, V.P; OLIVEIRA, D.F; PFENNING, L.H. Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 245-250. 2001.

COSTA, S. S. R., SANTOS, M. S. N. A., RYAN, M. F. Effect of *Artemisia vulgaris* Rhizome Extracts on Hatching, Mortality, and Plant Infectivity of *Meloidogyne megadora*. **Journal of Nematology**, v.35, p.437–442. 2003.

COSTA, M. S. Acetogenin a tool to control *Aedes aegypti*: a perspective of toxicity and gene regulation. Tese de doutorado. Viçosa, 2016.

DANG Q. L., KIM W.K., NGUYEN C.M., CHOI Y. H., CHOI G. J., JANG K. S., PARK M. S., LIM C. H., LUU N. H., KIM J.-C. Nematicidal and Antifungal Activities of *Annonaceous* Acetogenins from *Annona squamosa* against Various Plant Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 11160–11167. 2011.

DECRAEMER, W.; Hunt, D. J. Structure and classification. In: Perry RN, Moens M (eds) **Plant Nematology**. CABI Publishing, Wallingford. 2006.

DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D. P.; SARMENTO, M. C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**. v.24, p.203-210. 2000.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. 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.

ESTUPIÑAN-LÓPEZ, L.; CAMPOS, V. P.; SILVA A. P.; BARROS, A. F.; PEDROSO, M. P.; SILVA, J. C. P.; TERRA, W. C. Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. **Tropical plant pathology**, v.42, p.443–450. 2017.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**.

FERRAZ L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. (Orgs.), Manaus: Ed. NORMA, p. 251. 2016.

FERREIRA L.E., CASTRO P.M.N., CHAGAS A.C.S., FRANÇA S.C., BELEBONI R.O. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**. v.134 p. 327–332. 2013.

FEIST, E.; KEARN, J.; GAIHRE, Y.; O’CONNOR, V.; HOLDEN-DEY, L. The distinct profiles of the inhibitory effects of fluensulfone, abamectin, aldicarb and fluopyram on *Globodera pallida* hatching. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.165. 2020.

FONSECA Z. A. A. S., COELHO W. A. C., ANDRE W. P. P., RIBEIRO W. L. C., BESSA E. N., GALINDO V. R., PEREIRA J. S., AHID S. M. M. Use of herbal medicines in control of gastrointestinal nematodes of small ruminants: efficacies and prospects. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.7, p. 233 – 249. 2013.

GALBIERI, R. & BELOT, J. L. Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt, Cuiabá, MT, p.344. 2016.

GARCÍA ÁLVAREZ, A; DÍEZ-ROJO, M.A.; LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; BELLO, A. Materia orgánica, biofumigación y manejo de organismos del suelo patógenos de vegetales. **Conocimientos, técnicas y productos para la agricultura y la ganadería ecológica**. p. 71–76. 2004.

GARDIANO, C.G.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FERREIRA, P. A.; AMORA, D. X.; FREITAS, L. G. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, p. 551-556. 2009.

GEUM-SOOG, K.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L.L.; WU, F.; MCLAUGHLIN, J.L.; SASTRODIHARDJO S. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 432-436. 1998.

GIARETTA, R. D. FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; COUTINHO, M. M.; FERRAZ, S. 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. 7- 11. 2009

GOMES, V. A.; CAMPOS, V. P.; SILVA, J. C. P.; SILVA, F. J.; SILVA, M. F.; PEDROSO, M. P. Activity of papaya seeds (*Carica papaya*) against *Meloidogyne incognita* as a soil biofumigant. **Journal of Pest Science**, v.93, p.783-792. 2020.

GOMMERS, F.J. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. **Helminthological Abstracts**. v. 50, p. 9-21. 1981.

GU, Y. Q.; MO, M.H.; ZHOU, J.P.; ZOU, C.S.; ZHANG, K.Q. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 2567-2575. 2007.

GUPTA, A.; PANDEY, S.; SHAH, D.R.; YADAV, J.S.; SETH, N.R. Annonaceous Acetogenins: The Unrevealed Area for Cytotoxic and Pesticidal Activities. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 104-109. 2011.

HAYDOCK, P. P. J.; WOODS, S. R.; GROVE, I. G.; HARE, M. C. Chemical control of nematodes. In: Perry, R.N. & Moens, M. (Eds). **Plant nematology**, p. 459-479. (2013).

HENDERSON, D. R.; E. RIGA, R. A.; RAMIREZ, J.; WILSON, AND W. E. SNYDER. Mustard biofumigation disrupts biological control by *Steinernema* spp. nematodes in the soil. **Biological Control**, v. 48, p.316-322. 2009.

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

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

JAVED, N., GOWEN, S. R., INAM-UL-HAQ, M., ABDULLAH, K., & SHAHINA, F. Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. **Crop Protection**, v.26, p. 911–916. 2007.

JONES, J. T. HAEGEMAN, A., DANCHIN, E.G.J., GAUR, H.S., HELDER, J., JONES, M.G.K., KIKUCHI, T., MANZANILLA-LÓPEZ, R., PALOMARES-RIUS, J.E., WESEMAEL, W.M.L. et al. Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, New Jersey, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KAMARAJ, C.; BAGAVAN, A.; ELANGO, G.; ABDUZ ZAHIR, A.; RAJAKUMAR, G.; MARIMUTHU, S.; SANTHOSHKUMAR, T.; ABDUL RAHUMAN A. Larvicidal activity of medicinal plant extracts against *Anopheles subpictus* & *Culex tritaeniorhynchus*. **Indian Journal Medical Research**, v.134, p.101–106. 2011.

KAN HE; LU ZENG; QING YE; GUOEN SHI; NICHOLAS H.; OBERLIES; GENG-XIAN ZHAO; C.JESSE NJOKU; JERRY L. McLaughlin. Comparative Evaluations of SAR Annonaceous Acetogenins for Pesticidal Activity. **Pesticide Science**, v. 49, p. 372-378. 1997.

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

KNUDSEN, J.T. AND GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Eds.). **Biology of floral scent**. p.27-52. 2006.

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.

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.

LUNA, J. S.; CARVALHO, J. M.; LIMA, M. R. F.; BIEBER, L. W.; BENTO, E. S.; FRANCK, X.; SANT'ANA, A. E. G. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Natural Product Research**, v. 20, n. 3, p. 253-257. 2006.

McCarter, J. P. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematodes. R. H. Berg and C. G. Taylor (eds.) **Cell Biology of Plant Nematode Parasitic - Plant Cell Monographs**. p. 239- 267. 2008.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI H.M.; KADIR, H.A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p.15625–15658. 2015.

- MOLINARI, S. Antioxidant enzymes in (a) virulent populations of root-knot nematodes. **Nematology**, College Park, v. 11, p. 689-697. 2009.
- MONTEIRO, T. S. A.; NASU, E. G. C.; GUIMARÃES, C. P.; NEVES, W. S.; MIZOBUTSIIV E. H.; FREITAS, L. G. Redução de inóculo de *Aphelenchoides besseyi* em sementes de *Brachiaria brizantha* tratadas com óleos essenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1149-1154, jul. 2014.
- MOREIRA, F. J. C.; SANTOS, C. D. G.; INNECCO, R.; SILVA, G. S. Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) raça 2, com óleos essenciais em solo. **Summa Phytopathology**. v. 41, n. 3. p. 207-213. 2015.
- NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; COUTINHO, M. M.; FERRAZ, S.; PARREIRA, D. F. Incorporação de Farinha de Semente de Mamão ao Solo para o Controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 36, n.1-2, p. 25-31. 2011.
- NDJONKA, D.; AGYARE, C.; LÜERSEN, K.; DJAFSIA, B.; ACHUKWI, D.; NUKENINE, E.N.; HENSEL, A.; LIEBAU E. In vitro activity of Cameroonian and Ghanaian medicinal plants on parasitic (*Onchocerca ochengi*) and free-living (*Caenorhabditis elegans*) nematodes. **Journal of Helminthology**, v.85, p. 304-312. 2011.
- 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.
- NICULAU, E. S. Estudo químico de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e sua influência no perfil químico de *Citrus sinensis*. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos: UFSCar. 2015.
- NIST. NIST Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology. 2013.
- NOLING, J.W. Nematode management in okra (Fact Sheet ENY-043) in Florida nematode management guide. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperatives Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2002.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDIA, U. 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**, v. 67, p. 341-351. 2011.
- NUNES, A. S.; CAMPOS, V. P.; MASCARELLO, A.; STUMPF, T. R.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; MACHADO, A. R. T.; JUNIOR, H. M. S.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; OLIVEIRA, D. F. Activity of chalcones derived from 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde against *Meloidogyne exigua* and in silico interaction of one chalcone with a putative caffeic acid 3-O-methyltransferase from *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 661-668, 2013.
- OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic amendments. **A. review Applied Soil Ecology**. v.44, p.101-115. 2009.

ORTU, E.; SANNA, G.; SCALA, A.; PULINA, G.; CABONI, P.; BATTACONE, G. In vitro anthelmintic activity of active compounds of the fringed rue *Ruta chalepensis* against dairy ewe gastrointestinal nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 91, p. 447, 453. 2017.

PEDROSO, L. A.; CAMPOS V. P.; PEDROSO M. P.; BARROS A. F.; FREIRE E. S.; RESENDE F. M. P. Volatile organic compounds produced by castor bean cake incorporated into the soil exhibit toxic activity against *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**. v.75, p. 476-483. 2019a.

PEDROSO, L. A.; CAMPOS V. P.; BARROS A. F.; JUSTINO, J. C.; PAULA, L. L. Activity against *Meloidogyne incognita* of volatile compounds produced during amendment of soil with castor bean cake. **Nematology**, v. 0, p. 1-10. 2019b.

PENNARUN, A.; PROST, C.; HAURE, J.; DEMAIMAY, M. Comparison of Two Microalgal Diets. 2. Influence on Odorant Composition and Organoleptic Qualities of Raw Oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2011-2018. 2003.

PIEDRA BUENA, A.; GARCÍA ÁLVAREZ, A.; DÍEZ ROJO, M. A.; ROS, C.; FERNÁNDEZ, P.; LACASA, A.; BELLO. Use of pepper crop residues for the control of root knot nematodes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2846-2851. 2007.

PINTO, A.C. Q.; CORDEIRO M. C. R.; ANDRADE, S. R. M.; FERREIRA, F. R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; KINPARA, D. I. *Annona* species. Southampton, UK: University of Southampton - International Centre for Underutilised Crops, p. 268. 2005.

PLOEG, A.T. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. Single Gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Nematology** v. 2, p. 489–493. 2000.

PLOEG, A. Biofumigation to manage plant-parasitic nematodes, in Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. **Integrated Management and Biocontrol of Vegetable**, Springer, p. 239-248.

RITZINGER, C.H.S.P. AND MCSORLEY, R. Effect of castor and velvet bean organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. **Journal of Nematology**. v. 30, p. 624–631. 1998.

ROH, H. S.; LIM, E. G.; KIM, J.; PARK, C. G.; Acaricidal and oviposition deterring effects of santalol identified in sandalwood oil against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 495-501. 2011.

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

SÃO-JOSÉ, A.R.; ANGEL, D.N.; BONFIM, M.P.; REBOUÇAS, T.N.H. Cultivo da graviola. In: SEMANA INTERNACIONAL DE FRUTICULTURA E AGROINDÚSTRIA. Fortaleza: Sindifruta, Instituto Frutal, v.7. p.35. 2000.

SIKORA, R. A.; FERNÁNDEZ, E. Nematode parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Cambridge: CABI Publishing, cap. 9, p. 319-392. 2005.

SILVA, J. C. P.; CAMPOS, V. P.; BARROS, A.F; PEDROSO, L. A.; SILVA, M. F.; SOUZA, J. T.; PEDROSO, M. P.; MEDEIROS, F. H. V. Performance of volatiles emitted from different plant species against juveniles and eggs of *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 116, p. 196-203. 2019.

SILVA, J. C. P.; CAMPOS, V. P.; BARROS, A. F.; TERRA, W. C. Compostos Orgânicos voláteis no Controle de Fitonematoides. Editora UFLA, Lavras. 100 p. 2019.

SILVA, M. F.; CAMPOS, V. P.; BARROS, A. F.; TERRA, W. C.; PEDROSO, M. P.; GOMES, V. A.; RIBEIRO, C. R.; SILVA, F. J. Volatile emissions of watercress (*Nasturtium officinale*) leaves and passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds against *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, v. 76, p. 1413–1421. 2020a.

SILVA, M. F.; CAMPOS, V. P.; BARROS, A. F.; SILVA, J. C. P.; PEDROSO, M. P.; SILVA, F. J.; GOMES, V. A.; JUSTINO, J. C. Medicinal plant volatiles applied against the root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 130. 2020b.

SOUSA, R.M.O.F.; ROSA, J. S.; SILVA, C. A.; ALMEIDA, M. T. M.; NOVO, M. T.; CUNHA, A. C.; FERNANDES-FERREIRA, M. Larvicidal, molluscicidal and nematicidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. **Journal Pest Science**. V.88, p. 413–426. 2015.

SOUZA, M. M.C.; BEVILAQUA, C. M.L.; MORAIS, S. M.; COSTA, C. T.C.; SILVA, A. R.A.; BRAZ-FILHO, R. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.80, p.271-277. 2008.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p. 16-21. 1999.

TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P.; PEDROSO, MÁRCIO P. ; COSTA, A. L. ; FREIRE, E. S. ; PINTO, I. P. ; SILVA, J. C. P. ; Estupiñan-López, L. ; SANTOS, T. C. N. . Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**. v. 00, p. 1-6. 2017.

TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P.; MARTINSB, S. J.; COSTAC, L. S. A. S.; SILVA, J. C. P.; BARROS, A. F.; ESTUPIÑAN-LOPEZA, L.; SANTOSA, T. C. N.; SMANTD G.; OLIVEIRA, D. F. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v.106, p.125-131. 2018.

TIHOHOD, D. Guia prático para identificação de fitonematóides. Jaboticabal: **CA/FAPESP**. p. 67. 1997.

TRUDGILL, D.L., BLOK, V.C. Apomictic, Polyphagous Root-Knot Nematodes: Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v.39, p. 53-77. 2001.

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

VAZ, J. C. **Uso da ecologia química para o controle do *Alphitobius diaperinus* na Avicultura**. 136 f. Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

YUAN JS, HIMANEN SJ, HOLOPAINEN JK, CHEN F AND STEWART JCN. Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 24, p.323–331. 2009.

WANG, K.H.; SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. **Nematropica** 31, 237–251. 2002.

WIRATNO; TANIWIRYONOC, D.; VAN DEN, H. B.; RIKSEND, J.A.G.; RIETJENSB, I.M.C.M.; DJIWANTIA, S.R; KAMMENGAD, J.E.; MURKB, A.J. Nematicidal Activity of Plant Extracts Against the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p.77-85. 2009.

WU, F.E.; ZENG, L.; GU, Z.M.; ZHAO, G.X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J.T.; MCLAUGHLIN, J.L.; SASTRODIHARDJO, S. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.58, p. 909-915. 1995.