



SIMONE RIBEIRO DE SOUZA

O volatiloma da manipueira controla *Meloidogyne javanica*

**LAVRAS – MG
2021**

SIMONE RIBEIRO DE SOUZA

O volatilo da manipueira controla *Meloidogyne javanica*

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

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

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

Souza, Simone Ribeiro.

O volatiloema da manipueira controla *Meloidogyne javanica* /
Simone Ribeiro Souza. - 2021.

37 p.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Coorientador(a): Willian César Terra.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Manipueira. 3. Compostos Orgânicos
Voláteis. I. Campos, Vicente Paulo. II. Terra, Willian César. III.
Título.

SIMONE RIBEIRO DE SOUZA

O volatilo da manipueira controla *Meloidogyne javanica*

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 24 de novembro de 2021

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira UFLA

Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva UFSM

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

LAVRAS - MG
2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e São Bento, por me concederem força e sabedoria para viver a vida.

A Vanessa, minha amiga irmã, que me deu o incentivo para estudar e me qualificar como mestre.

Ao meu amor Célio Roberto, que me faz viver dias mais felizes.

Ao professor Dr. Vicente Paulo Campos, pela disponibilidade em me aceitar como orientada, acreditar e incentivar com sua infinita sabedoria.

Ao Willian que me conduziu por este estudo, com seus conhecimentos e busca por sabedoria.

Aos meus amigos do Laboratório de Nematologia, pelo apoio e amizade, em especial Letícia, que esteve junto desde o início desta jornada e ao Tarlei com que compartilho os conhecimentos do dia-dia, do trabalho com os nematoides.

Aos professores Dr. Marcio Pedroso e Júlio Bueno pela grande colaboração nas análises de GC e estatísticas.

Aos amigos da Terras Gerais, Daiana e Damiani, que deram o suporte necessário para finalização desta etapa e pela nossa amizade e companheirismo.

À minha família, pai, mãe, irmãos, sobrinhas e prima Letícia, pelo apoio e amor incondicional.

RESUMO

A manipueira, resíduo líquido de fecularias, é conhecida por sua atividade nematicida. Porém a ação contra o nematoide de vários dos seus componentes voláteis ainda é desconhecida. Neste estudo foram caracterizados os compostos orgânicos voláteis (COVs) do volatiloma da manipueira e seus efeitos tóxicos a *Meloidogyne javanica*. Para isto, utilizou-se a técnica do tubo Supelco[®], no qual foram colocados areia esterilizada, 20 mL de manipueira e um micro tubo parcialmente enterrado na areia. O tubo foi vedado e, após três dias, foi colocada suspensão aquosa contendo 200 juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide no micro tubo com o uso de uma seringa. Após 48 horas, observou-se que os COVs emitidos pela manipueira causaram ~ 88% de mortalidade dos J2. Quando os J2 expostos aos COVs da manipueira foram inoculados em tomateiros o fator de reprodução do nematoide foi de 0,37. Segundo análise por cromatografia acoplada à espectrometria de massas, no volatiloma da manipueira havia oito COVs, dentre os quais se destacaram o butanoato de etila e ácido butanoico que, *in vitro*, apresentaram concentração letal 50% (CL₅₀) dos J2 iguais a ~270 µg mL⁻¹ e 176 µg mL⁻¹, respectivamente. Em tomateiros cultivados em substrato previamente inoculado com ovos do nematoide e tratados com Basamid (0,25g) e butanoato de etila (500 ou 1000 µL) não foram encontrados ovos 45 dias após o transplante dos tomateiros para o substrato. Embora menos eficiente, o ácido butanoico (500 ou 1000 µL) reduziu significativamente o número de galhas e ovos nos tomateiros quando comparado com o controle água.

Palavras Chaves: Volatiloma, Fumigação, *Meloidogyne* spp.

ABSTRACT

Cassava, a liquid residue from starch plants, is known for its nematicidal activity. However, the action against the nematode of several of its volatile components is still unknown. In this study, the volatile organic compounds (VOCs) of manipueira volatiloma and their toxic effects on *Meloidogyne javanica* were characterized. For this, the Supelco® tube technique was used, in which sterilized sand, 20 mL of manipueira and a micro tube partially buried in the sand were placed. The tube was sealed and, after three days, an aqueous suspension containing 200 second-stage juveniles (J2) of the nematode was placed in the micro tube using a syringe. After 48 hours, it was observed that VOCs emitted by manipueira caused ~88% of J2 mortality. When J2 exposed to cassava VOCs were inoculated into tomato plants, the nematode reproduction factor was 0.37. According to analysis by chromatography coupled to mass spectrometry, in manipueira volatiloma there were eight VOCs, among which ethyl butanoate and butanoic acid stood out, which, in vitro, presented a lethal concentration of 50% (LC50) of J2 equal to ~270 µg mL⁻¹ and 176 µg mL⁻¹, respectively. In tomato plants grown in substrate previously inoculated with nematode eggs and treated with Basamid (0.25g) and ethyl butanoate (500 or 1000 µL) no eggs were found 45 days after transplanting the tomato plants to the substrate. Although less efficient, butanoic acid (500 or 1000 µL) significantly reduced the number of galls and eggs on tomato plants when compared to the water control.

Keywords: Volatilome, Fumigation, *Meloidogyne* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de dose-resposta de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* expostos a compostos com atividade nematicida. Os J2 de *M. javanica* foram expostos, por 48 h, a diferentes concentrações dos compostos butanoato de etila (A e C) e ácido butanoico (B e D). As curvas de dose-resposta foram determinadas usando modelo logístico. Os círculos sem preenchimento indicam os dados brutos coletados em cada unidade experimental. O intervalo de confiança de 95% é representado pela região sombreada ao redor da curva. 27
- Figura 2.** Número de galhas nos sistemas radiculares de tomateiro cultivado em substrato infestado com ovos de *Meloidogyne javanica* após a fumigação com os compostos ácido butanoico (AB) e butanoato de etila (EB) nas doses de 0.2, 0.5 e 1 mL. O nematicida comercial Basamid (DAZO) foi utilizado como controle positivo. Os pontos coloridos representam os dados preditos pelo modelo para cada unidade amostral de cada tratamento. 28
- Figura 3.** Número de ovos nos sistemas radiculares de tomateiro cultivado em substrato infestado com ovos de *Meloidogyne javanica* após a fumigação com os compostos ácido butanoico (AB) e butanoato de etila (EB) nas doses de 0.2, 0.5 e 1 mL. A nematicida comercial Basamid (DAZO) foi utilizado como controle positivo. Os pontos coloridos representam os dados preditos pelo modelo para cada unidade amostral de cada tratamento. 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> mortos após exposição por 24 horas aos COVs emitidos pela manipueira.	24
Tabela 2. Ovos por grama de raiz e fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne javanica</i> após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2), por 24 horas, aos COVs da manipueira.	24
Tabela 3. Compostos orgânicos voláteis identificados na manipueira por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, através da microextração em fase líquida (SPME-CG-MS).....	25
Tabela 4. Parâmetros das equações logísticas para as curvas dose-reposta de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> expostos ao ácido butanoico ou butanoato de etila.....	26
Tabela 5. Doses que resultaram em 50% de mortalidade da população de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> (CL ₅₀).....	26

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1	Os fitonematoides.....	14
2.2	Manipueira, um resíduo de fecularias.	15
2.3	Ação dos compostos orgânicos voláteis (COVs)	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Coleta da manipueira.....	18
3.2	Obtenção de juvenis e ovos de <i>Meloidogyne javanica</i>	18
3.3	Atividade nematicida dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela manipueira sobre juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	19
3.4	Reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) aos voláteis emitidos pela manipueira.....	19
3.5	Caracterização dos compostos orgânicos voláteis de manipueira.....	20
3.6	Concentração letal média (CL 50) dos compostos ácido butanoico e butanoato de etila contra juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. javanica</i>	21
3.7	Fumigação com ácido butanoico e butanoato de etila no controle de <i>M. javanica</i> em tomateiros em casa de vegetação	21
3.9	Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	22
4	RESULTADOS	24
4.1	Atividade nematicida dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela manipueira sobre juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	24
4.2	Reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) aos voláteis emitidos pela manipueira.....	24
4.3	Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis	25
4.4	Concentração letal média (CL 50) dos compostos ácido butanoico e butanoato de etila contra juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. javanica</i>	25
4.5	Fumigação com ácido butanoico e butanoato de etila no controle de <i>M. javanica</i> em tomateiros em casa de vegetação	27
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÕES	32

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

1 INTRODUÇÃO

Os danos causados pelo parasitismo de nematoides nas lavouras têm provocado prejuízos que chegam a US\$ 118 bilhões para a agricultura mundial, alcançando perdas de 14,6% na produção agrícola em regiões tropicais e subtropicais (ABAD et al., 2008; NICOL et al., 2011). Os nematoides de galhas, *Meloidogyne* spp., são responsáveis por 70% dos prejuízos totais causados pelos fitonematoides (SASSER; FRECKMAN, 1987). A formação de galhas, caracterizadas como engrossamentos radiculares nas raízes parasitadas por *Meloidogyne* spp., impede que o sistema radicular exerça de forma eficiente a sua função de absorção de água e nutrientes, comprometendo o desenvolvimento da planta e causando prejuízos nas colheitas (VILLAIN, 2018).

O manejo dos fitonematoides pode ser feito por meio de diversas práticas, como manejo de enxurrada e plantas invasoras, rotação de culturas, uso de culturas armadilha, plantio de cultivares resistentes, aplicação de nematicidas químicos e uso de agentes biológicos. Entretanto, quando comparados a inseticidas e fungicidas, são poucos os nematicidas com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019). Uma alternativa empregada pelos produtores no controle de fitonematoides é o uso de resíduos e subprodutos da agropecuária como esterco, compostagem e resíduos vegetais (OKA, 2010). Dentre tais alternativas cabe destacar a manipueira, que se trata do resíduo líquido da industrialização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pois tal resíduo tem demonstrado ótima eficácia no controle de fitonematoides (RODRÍGUEZ KÁBANA, 1986; SIKORA & FERNANDEZ, 2005, FURLANETTO, 2010).

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que compostos orgânicos voláteis (COVs), emitidos por resíduos da agroindústria, podem ser tóxicos aos fitonematoides (SIQUEIRA et al., 2021). COVs são a base de carbono que apresentam alta pressão de vapor e são capazes de atravessar de membranas (DUDAREVA et al., 2006). Como podem movimentar-se pela porosidade do solo, há a possibilidade de utilização dos COVs como fumigantes, constituindo assim uma alternativa viável para o controle de fitonematoides. A produção de COVs é comum na natureza, principalmente por plantas (PICHERSKY et al., 2006; DUDAREVA et al., 2013), mas também pode ocorrer devido a microrganismos presentes no solo (ISIDOROV & 30 JDANOVA, 2002; LEFF & FIERER, 2008; GU et al., 2007; RIGA et al., 2008; HUANG et al., 2010; FREIRE et al., 2012) e por resíduos da agroindústria (SIQUEIRA, et. al., 2021). O

desenvolvimento de técnicas em geral tem facilitado os estudos sobre a atividade dos COVs sobre os nematoides fitopatogênicos (BARROS et al., 2014). Por exemplo, a partir da técnica do tubo SUPELCO® foi possível comprovar que emissões gasosas provenientes de diversas espécies vegetais e de resíduos são tóxicas a nematoides (PEDROSO, 2016; SILVA et al., 2019; PEDROSO et al., 2019; SIQUEIRA et al., 2021).

A manipueira tem sido útil na produção de biogás ou de biossurfactantes (SANTOS, 2009; UBALUA, 2007). Já na agricultura, tem sido utilizada como fertilizante, alimento para o gado, controle de fungos, insetos, plantas invasoras dentre outras utilidades (BEZERRA et al., 2017; VIETES & BRINHOLI, 1994; SANTOS E PONTE, 1993; PONTE, FRANCO E SANTOS, 1988). O uso da manipueira no controle de fitonematoides foi descrito em diversos trabalhos (PONTE & FRANCO, 1981; PONTE, TORRES & FRANCO, 1979). Por exemplo, NASU et al. (2010) demonstraram que a exposição direta de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood a diferentes concentrações da manipueira, resultou em 100% de controle do nematoide em raízes de tomateiro demonstrando a eficiência da manipueira aplicada diretamente em solo infestado com J2. Em aplicação única em vasos, a manipueira reduziu o número de ovos e J2 de *M. javanica* na raiz e promoveu o maior desenvolvimento radicular de plantas de soja (FONSECA et al., 2018). Apesar de diferentes estudos comprovarem a eficácia do uso da manipueira no campo para o manejo de fitonematoides, o potencial nematicida dos voláteis presentes na manipueira ainda não foi profundamente estudado.

No presente estudo se avaliou a atividade nematicida dos COVs emitidos pela manipueira em J2 de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood. Para tanto: a) buscou-se averiguar a atividade nematicida *in vitro* dos COVs emitidos pela manipueira contra J2 de *M. javanica*; b) Quantificou-se a infectividade dos J2 expostos aos COVs da manipueira; c) Por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, caracterizaram-se os COVs emitidos pela manipueira; d) Os principais COVs foram submetidos a testes *in vitro* para os cálculos de suas concentrações letais médias (CL₅₀) dos J2 de *M. javanica*; e) E finalmente, ensaios foram realizados em casa de vegetação, para avaliar os potenciais dos principais COVs como nematicidas fumigantes.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Os fitonematoides.

Os fitonematoides são microrganismos filiformes, medindo entre 0,2 e 3,0 mm (FERRAZ, 1985). Parasitam diversas espécies vegetais, tendo como alvo principal o sistema radicular e partes subterrâneas. Porém, outros órgãos podem ser atacados por algumas espécies. Eles se alimentam do conteúdo celular, sugando-o através do estilete e possuem diversos modos de vida. Dentre eles se encontram as espécies do gênero *Meloidogyne*, que são endoparasitas sedentários, pois invadem os tecidos vegetais e estabelecem os seus sítios de alimentação.

Os danos causados pelos nematoides fitopatogênicos comprometem o desenvolvimento das plantas, causando sintomas variados como aparente déficit hídrico, deficiência nutricional, murchas e redução no crescimento, além de interagir com outros microrganismos patogênicos, aumentando as perdas ou levando a morte dos hospedeiros (TIMMER et al., 2003). Os prejuízos causados pelo parasitismo de nematoides são difíceis de mensurar. Entretanto, alguns autores estimam que as perdas variam entre US\$ 80 - 118 bilhões para a agricultura mundial, chegando a 14,6% de perdas na produção agrícola em regiões tropicais e subtropicais (NICOL et al., 2011; BERNARD et al., 2017). As condições ambientais e a falta de cuidados com implementos agrícolas, mudas e manejo, têm favorecido a disseminação e a sobrevivência dos fitonematoides nas regiões tropicais e subtropicais, aumentando a incidência desses patógenos.

O controle de nematoides envolve diferentes práticas de manejo, como o controle de enxurradas, uso de plantas resistentes, cuidados com implementos e mudas, rotação de cultura, alqueive e o uso de resíduos, subprodutos de origem vegetal (OKA, 2010; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1986) e de nematicidas químicos e biológicos. Nos últimos anos tem-se observado aumento no número de produtos à base de microrganismos para o controle de fitonematoides e a retirada do mercado de nematicidas químicos eficazes, porém altamente tóxicos (SOUZA et al., 2015; NOLING, 2002; CAMPOS, 1997; NUNES et al., 2008). Entretanto novos nematicidas têm surgido no mercado, com moléculas mais seletivas, menos tóxicas e mais seguras, favorecendo o equilíbrio da microbiota do solo (DESAEGER et. al., 2021).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como nematoides de galhas, são os que mais causam danos (SASSER; FRECKMAN, 1987). Eles são

provavelmente, os fitonematoides mais disseminados e parasitam mais de 2.000 espécies de plantas (SASSER, 1980), dentre as quais estão culturas economicamente importantes como café, soja, algodão, feijão e diversas hortaliças. Além disso, cabe mencionar que eles também parasitam várias plantas invasoras, o que dificulta o controle da doença (SIKORA, FERNANDEZ, 2005).

O processo de parasitismo de *Meloidogyne* spp. se inicia com a penetração do J2, preferencialmente pela região da coifa. Após migrar pelos feixes vasculares e estabelecer o seu sítio de alimentação, o J2 libera proteínas efetoras que estimulam a hiperplasia e hipertrofia das células, levando à formação das galhas nas raízes, que impedirão o sistema radicular de exercer a sua função de absorção de água e nutrientes de forma eficaz, causando clorose na parte aérea, diminuição no tamanho da planta, murcha, folhas carijós e consequente redução da produção (VILLAIN, 2018).

Mesmo com novos princípios ativos no mercado as opções de controle de fitonematoides com nematicidas químicos é reduzida (NOLING, 2002; ANVISA 2017). Desta forma, faz se necessário a busca por novas moléculas eficazes no controle dos fitonematoides, porém menos tóxicas ao meio ambiente.

2.2 Manipueira, um resíduo de fecularias.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (Euphorbiaceae) é uma planta perene originária da América do Sul (HOWELER, et al., 2013; NASSAR, 2000). As suas raízes acumulam amido no parênquima, tornando-se um órgão importante e rico em carboidratos (MONTAGNAC, et al., 2009), servindo como alimento básico principalmente para famílias de baixa renda e como alternativa de renda para pequenos produtores (HOWELER et al., 2013; NWEKE, et al., 2002).

Nós últimos anos houve aumento no consumo de produtos a base do amido da mandioca o que fez com que a produção duplicasse, chegando a 252 milhões de toneladas (HOWELER et al., 2013). Entretanto, a produção não aumentou na América Latina. Mesmo assim, o Brasil continua a ser o segundo maior produtor mundial de mandioca, ao lado da Nigéria, Tailândia e Indonésia (WORLDDATLAS, 2017). O rendimento da produção da farinha varia de 25 a 30%, dependendo do tipo de mandioca e dos equipamentos utilizados na fabricação.

O gênero *Manihot* é conhecido por sintetizar e acumular glicosídeos cianogênicos como a linamarina e lotoaustralina, que são encontrados em diferentes

tecidos da planta (POULTON, 1990), incluindo as raízes (NASSAR, 2000). Dois genótipos se diferenciam pelo seu potencial cianogênico, um deles é popularmente conhecido como “brava” por conter mais de 100 mg de HCN / kg nas raízes frescas, e outro chamado de “doce” que geralmente contém menos de 50 mg de HCN / kg nas raízes frescas (CARDOSO et al., 2005). Na farinha seca ou d’água os teores de cianeto variam entre 3 e 20 mg HCN/Kg. O uso incorreto e o consumo exagerado de mandioca, pode levar a doenças neurológicas irreversíveis causada por doses sub-letais de cianeto, bócio devido a ação tóxica na tireóide e outras doenças respiratórias e cardíacas (CEREDA, 2003; BRADBURY et al., 2011).

Durante o processo de industrialização das raízes da mandioca para obtenção da farinha é liberado um resíduo líquido amarelado, chamado pelos indígenas de “manipueira”, rico em macro e micronutrientes, além da linamarina que quando hidrolisada forma acetona e ácido cianídrico (HCN) (FIORETTO, 1994; MAGALHÃES et al., 2000; PONTE, 2001). Segundo Santos (2009) uma tonelada de raízes de mandioca produz aproximadamente 300 L de água residual de mandioca durante a produção de 200 a 300 quilos de farinha.

É necessário que os resíduos gerados por fecularias sejam descartados de forma adequada, sendo inicialmente acondicionado em tanques de evaporação, o que em alguns casos não ocorre, contaminando rios, solos e lençóis freáticos (SOUZA et al., 2014), causando desequilíbrios ecológicos nos cursos de água.

Pesquisas feitas no Brasil desde 1980 têm desenvolvido meios minimizar os efeitos negativos para o meio ambiente, de forma a poder utiliza-la na indústria e agricultura. Devido a sua composição química e biológica, a manipueira demonstrou grande potencial para a produção de fertilizantes, bem como no controle de plantas invasoras (BEZERRA et al., 2017; FIORETTO, 2001; VIETES e BRINHOLI, 1994), fungos (SANTOS e PONTE, 1993) e insetos (PONTE, FRANCO e SANTOS, 1988). Já na indústria a manipueira tem sido aplicada na produção de biogás e como biossurfactantes em meios de crescimento para microrganismos produtores de compostos aromáticos (MEDEIROS et.al., 2000; SANTOS, 2009; UBALUA, 2007).

A atividade nematicida da manipueira é conhecida há muitas décadas. Pesquisas foram realizadas *in vitro* colocando o resíduo líquido em contato direto com ovos e juvenis, bem como em solo infestado com diferentes gêneros de fitonematoides (PONTE & FRANCO, 1981; PONTE, TORRES & FRANCO, 1979). Em teste *in vitro* a manipueira em concentrações de até 10% da sua concentração original, resultou em

100% de controle de *M. javanica* (NASU *et al.*, 2010). Corroborando com os estudos de Ponte *et al.* (1987) e Franco *et al.*, (1990), Nasu e seus colaboradores (2015) obtiveram resultados eficazes de controle quando aplicaram a manipueira na dose de 4L/m² em solos com tomareitos parasitados por *M. javanica*.

Um dos componentes da manipueira, o cianeto, quando aplicado em substrato na dose de 4mg/L causou a morte dos J2 de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp. (COMERLATO, 2009; NASU, 2008). Além disso, o uso da manipueira quando aplicada no solo de lavouras de tomate, a manipueira trouxe incrementos na produtividade e desenvolvimento das plantas (FRANCO *et al.* 1990; NASU *et al.* 2010).

Apesar de várias comprovações da atividade nematicida *in vitro* e em campo, a ação dos COVs da manipueira, além do cianeto, não foram pesquisados anteriormente para o controle de fitonematoides.

2.3 Ação dos compostos orgânicos voláteis (COVs)

Em linhas gerais, os compostos orgânicos voláteis (COVs) são substâncias a base de carbono, com baixa massa molecular. As propriedades físicas desses compostos permitem que atravessem membranas e sejam dispersos rapidamente no meio circundante. Estão incluídos entre os COVs, os componentes de substâncias químicas com os isoprenoides (isopreno e monoterpênicos), alquenos, álcoois, bem como ésteres, éteres e ácidos (KESSELMEIER & STAUDT, 1999). A biosíntese de COVs é comum na natureza, podendo ocorrer em plantas (PICHERSKY *et al.*, 2006; DUDAREVA *et al.*, 2013) ou em microrganismos presentes no solo (ISIDOROV & JDANOVA, 2002; LEFF & FIERER, 2008; GU *et al.*, 2007; RIGA *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2012). Os tecidos vegetais podem ser repositórios de COVs que, podem ser mais seguros para o meio ambiente, do que as moléculas sintéticas comercializadas (CHITWOOD, 2002).

O desenvolvimento de técnicas em geral tem facilitado o estudo da ação dos COVs no controle de nematoides fitopatogênicos (BARROS *et al.*, 2014). Na última década, no Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), foram realizados diversos estudos que identificaram a atividade nematicida de COVs emitidos por resíduos vegetais. Pode-se citar, por exemplo, os COVs emitidos a partir de farelo de sementes de algodão, que foram tóxicos aos J2 de *M. javanica* (ESTUPIÑAN-LÓPEZ L., *et al.*, 2017). Os COVs emitidos pela torta de mamona, já

conhecida por sua atividade nematicida, alteram a mobilidade e causaram alta mortalidade em J2 de *M. javanica* (PEDROSO, et al. 2019). A ação nematotóxica de COVs emitidos por macerados de nim e mostarda também foi observada em J2 de *M. javanica*, bem como na redução do número de galhas e ovos (BARROS et al. 2014b).

Os resíduos vegetais possuem uma diversidade de COVs com estruturas químicas variadas, conhecida como volatiloma. As análises desses COVs podem ser feitas, por exemplo, através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (AUGUSTO, 2000). Utilizando técnicas desenvolvidas na Universidade Federal de Lavras (UFLA), como a do tubo SUPELCO®, é possível determinar as ações de diferentes COVs sobre ovos e juvenis de nematoides, sem a interferência do substrato (BARROS et al., 2014). A biofumigação, utilizando garrafas PET, possibilita o aprisionamento dos gases emitidos pela mistura do solo com substância emissora, formando a câmara de gás (JARDIM et al., 2017). Desta forma, a comprovação da atividade tóxica das emissões voláteis e de seus componentes aos fitonematoides, ficou mais segura e com ampla aceitação pela comunidade científica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta da manipueira

A manipueira utilizada nos ensaios foi recolhida em garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 2 litros, diretamente de tanques de fecularias de pequenos produtores nos municípios de Alpinópolis e Araxá, Minas Gerais e misturadas para realização dos testes. A mandioca utilizada para a produção da farinha foi do tipo brava, cultivar IAC 13. O líquido coletado foi armazenado hermeticamente fechado, em câmara fria na temperatura de 10°C.

3.2 Obtenção de juvenis e ovos de *Meloidogyne javanica*

Os J2 e ovos utilizados nos experimentos foram obtidos de populações puras de *M. javanica* multiplicadas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Nematologia - UFLA. A suspensão de ovos foi obtida conforme a técnica de Hussey e Barker (1973). Para tal, as raízes de tomateiros foram cuidadosamente lavadas em água parada para retirar partículas de substrato

aderidas, picadas em pedaços de, aproximadamente, 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5% por, aproximadamente, 40 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em jogo de peneiras de 0,074 mm de abertura (200 “mesh”), acoplada à de 0,025 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos nesta última. Os ovos foram imediatamente lavados com água e, quando houve a necessidade da utilização de J2 a suspensão de ovos foi incubada em câmara de eclosão a 28 °C, sendo utilizados apenas os J2 eclodidos após 48 horas.

3.3 Atividade nematicida dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela manipueira sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

A técnica utilizada para a execução deste ensaio foi desenvolvida por Barros et al., (2014a). No interior de tubos Supelco (80 × 28mm, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EUA)[®] foram depositados 35 g de areia, na superfície da qual se adicionaram 20 mL de manipueira, dose baseada na recomendação de Nasu (2010). Como controle negativo, utilizou-se 20 mL de água destilada esterilizada, substituindo a manipueira. A seguir, um micro tubo com volume de 1,5 mL foi parcialmente enterrado na areia. Para a formação da câmara de gás, os frascos foram vedados e incubados a 28 °C no escuro por três dias. Decorrido este período, uma suspensão contendo, aproximadamente, 150 J2 de *M. javanica* foi injetada, com o uso de uma seringa, nos microtubos. Em seguida os tubos Supelco[®] foram novamente vedados e incubados a 28 °C (± 2° C) por 24 horas. Ao final deste período, os frascos foram abertos e as suspensões de J2 contidas nos microtubos foram transferidas para cavidades de uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Com o uso de um microscópio invertido se quantificaram os J2 móveis e imóveis. Após a contagem, as cavidades J2 foram preenchidas com água e deixadas por 24 h a 28 °C. Os J2 que permanecerem imóveis após esse período foram considerados como mortos. Foram realizados dois ensaios, empregando-se seis repetições para cada tratamento.

3.4 Reprodução de *Meloidogyne javanica* após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) aos voláteis emitidos pela manipueira

Para o teste de reprodução, os J2 foram expostos aos COVs emitidos pela manipueira, seguindo a mesma metodologia do ensaio anterior, e empregando os mesmos tratamentos. Porém, a suspensão aquosa colocada nos micro tubos continha 540 J2. Após a exposição aos COVs da manipueira por 24h, a suspensão foi dispersa em 4 mL de água e inoculada em mudas de tomateiros com 20 dias de idade plantadas em copos plásticos de 300mL contendo substrato artificial (60% casca de pinus, 15% vermiculita e 25% húmus; Tropstrato®, Mogi Mirim, SP, Brasil). Após a inoculação, as mudas foram mantidas em casa de vegetação. A avaliação do total de ovos e ovos por grama de raiz foi realizada aos 45 dias após a inoculação.

3.5 Caracterização dos compostos orgânicos voláteis de manipueira

Foram preparadas seis replicatas contendo dez mililitros das amostras da manipueira em frascos de SPME de 20 mL para a determinação das moléculas voláteis emitidas após o fechamento. Os parâmetros empregados para a microextração em fase sólida (SPME) no modo headspace (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990) foram os seguintes: 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 as intensidades dos picos nos cromatogramas. 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.u.a. 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 retenção experimentais foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos.

3.6 Concentração letal média (CL 50) dos compostos ácido butanoico e butanoato de etila contra juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*

Com base nas análises por GC-MS se selecionaram o ácido butanoico e o butanoato de etila para os testes de determinação de concentração letal média (CL 50). Estes compostos foram selecionados levando-se em consideração dois aspectos: *i.* maiores áreas de picos no cromatograma e *ii.* eficácia no controle ou CL50 desconhecidas para *Meloidogyne javanica* desconhecida. Para o ácido butanoico as concentrações utilizadas para determinar a CL₅₀ foram: 0, 150, 165, 180, 210, 280, 330 e 400 µg mL⁻¹, para o butanoato de etila as concentrações utilizadas foram de: 0, 100, 150, 200, 250, 350, 450 e 550 µg mL⁻¹. As diferentes concentrações das moléculas foram preparadas utilizando-se como agente solubilizante uma solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL. Os ensaios foram realizados utilizando-se micro tubos de 600 µL nos quais foram colocados 300 µL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 300 J2 e mais 300 µL da solução estoque de cada molécula a fim de alcançar as concentrações finais desejadas. Em seguida, os micro-tubos foram vedados e incubados a 28 °C por 48 h. Passado esse período de tempo, os micro tubos foram homogeneizados para que 100 µL fossem transferidos para uma placa de polipropileno com 96 cavidades, para observação e quantificação dos J2, que foram categorizados em móveis ou imóveis. Para saber se os nematoides imóveis estavam mortos, adicionaram-se 20 µL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1.0 mol L⁻¹ ao conteúdo da cavidade (CHEN; DICKSON, 2000). Os J2 que permaneceram imóveis por, aproximadamente, foram classificados como mortos.

3.7 Fumigação com ácido butanoico e butanoato de etila no controle de *M. javanica* em tomateiros em casa de vegetação

Para este ensaio foram utilizadas garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 2 L, nas quais foi colocado 1 L de substrato multiplant[®]. Os tratamentos consistiram do ácido butanoico na concentração de 964g/L e butanoato de etila na concentração 875g/L, as doses aplicadas foram 0 (somente água); 0,2, 0,5 e 1,0 mL por litro de substrato, seguindo a metodologia descrita por JARDIM *et al.*, (2017). Cada garrafa, recebeu uma suspensão aquosa contendo 18.000 ovos de *M. javanica*. Como controle positivo foi utilizado o nematicida fumigante Basamid[®] (i.a. Dazomete 980 g/Kg) a 0,25g/L de solo e como controle negativo foi empregada a água. A umidade do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de campo. As garrafas contendo as misturas foram vedadas com tampa e filme plástico, homogeneizadas e permaneceram três dias a 28 °C. Após esse período as garrafas foram abertas e o substrato transferido para bandejas, nas quais permaneceu por sete dias para a liberação dos voláteis remanescentes. Decorrido este período, o substrato foi, então, vertido em copos plásticos de 300 mL. Uma muda de tomateiro da cultivar Santa Clara, com 20 dias de idade, foi transplantada para cada copo e, após 60 dias, avaliaram-se: peso fresco da raiz, números de galhas e ovos no sistema radicular.

3.9 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

Todos os ensaios *in vitro*, à exceção do item 3.4, foram realizados com seis repetições em delineamento inteiramente casualizado e executados duas vezes. O ensaio do item 3.4 foi realizado somente uma vez com seis repetições.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas usando o software R (R Core Team 2017). Os dados dos ensaios “Atividade nematicida dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela manipueira sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*” e “Reprodução de *Meloidogyne javanica* após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) aos voláteis emitidos pela manipueira” foram previamente submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Barlett). As médias referentes aos dois tratamentos foram comparadas pelo teste de *t* ($P < 0,01$). Para determinar a CL₅₀, a partir da porcentagem de J2 mortos contabilizada no ensaio “Concentração letal média (CL 50) dos compostos ácido butanoico e butanoato de etila contra juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*” foi utilizado o modelo de regressão linear logística, através do pacote drc no programa R (Ritz et al. 2015), com quatro parâmetros potenciais, entretanto para o ácido butanoico (regressão 1) e

butanoato de etila (regressões 1 e 2) foram utilizados dois parâmetros, fixando as assíntotas inferiores e superiores da curva de dose-resposta. Para a regressão 2 do ácido butanoico foram utilizados três parâmetros, fixando apenas a assíntota inferior da curva de dose-resposta.

Para o ensaio “Fumigação de solo com duas moléculas visando o controle de ovos de *M. javanica* em tomateiros” os dados dos dois ensaios foram analisados em conjunto utilizando o modelo linear generalizado misto com distribuição de *Poisson*, ajustado por máxima verossimilhança.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade nematicida dos compostos orgânicos voláteis emitidos pela manipueira sobre juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Nos dois ensaios realizados os COVs emitidos pela manipueira foram altamente ($P < 0,01$) tóxicos aos J2 de *M. javanica*, causando mortalidade acima de 87% (Tabela 2).

Tabela 1. Porcentagem de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* mortos após exposição por 24 horas aos COVs emitidos pela manipueira.

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Experimento I	Experimento II
Água	13,62747	2,18
Manipueira	87,86*	98,68*

* Diferença significativa ($P < 0,01$) entre os tratamentos água estéril e manipueira 20 mL. Médias de seis repetições.

4.2 Reprodução de *Meloidogyne javanica* após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) aos voláteis emitidos pela manipueira

Os ovos extraídos de raízes de tomateiros infestados com J2 previamente expostos, por 24 horas, aos voláteis emitidos pela manipueira, corresponderam a apenas 2 % daqueles obtidos de raízes das plantas infestadas com J2 do controle (água). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($P = 0,01$). Consequentemente, o fator de reprodução (FR) dos J2 previamente expostos aos COVs da manipueira ficou bem abaixo de 1, o que significa que não foram capazes de aumentar a população do nematoide (Tabela 2).

Tabela 2. Ovos por grama de raiz e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne javanica* após exposição dos juvenis de segundo estágio (J2), por 24 horas, aos COVs da manipueira.

Tratamentos	Ovos/ g raiz	FR
Água	3294,54	12,04
Manipueira	70,968*	0,37

* Diferença significativa $P = 0,01$ para número de ovos por grama de raiz. Médias de seis repetições.

4.3 Caracterização dos Compostos Orgânicos Voláteis

Foram caracterizadas oito moléculas no volatiloma da manipueira. Cinco delas pertencentes à classe dos álcoois, uma dos ésteres, duas dos ácidos carboxílicos. Os compostos identificados foram categorizados em relação a sua intensidade em dois grupos: baixa (“v”) e alta (“vvv”). Apenas o ácido butanoico teve maior intensidade. (Tabela 3).

Tabela 3. Compostos orgânicos voláteis identificados na manipueira por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, através da microextração em fase líquida (SPME-CG-MS).

Compostos	Classe	IR. Exp	IR. Lit	Intensidade*
(1) Etanol	Álcool	-	-	+
(2) Propa-2-nol	Álcool	-	-	+
(3) Propan-1-ol	Álcool	-	-	+
(4) Butan-2-ol	Álcool	601	598	+
(5) Butan-1-ol	Álcool	657	668	+
(6) Ácido acético	Ácido carboxílico	669	642	+
(7) Butanoato de etila	Éster	800	802	+
(8) Ácido butanoico	Ácido carboxílico	815	790	++

*intensidade do pico: baixa (“v”) e alta (“vvv”)

4.4 Concentração letal média (CL 50) dos compostos ácido butanoico e butanoato de etila contra juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*

A partir do modelo utilizado para esta análise (item 3.9) podemos definir os valores dos parâmetros potenciais (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros das equações logísticas para as curvas dose-reposta de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* expostos ao ácido butanoico ou butanoato de etila

Molécula	Ensaio	Parâmetros do modelo			
		b^w	c^x	d^x	e^z
Ácido butanoico	I	-11,70 (1,2)* P < 0.001	fixado	0,84 (0,013) P < 0.001	175,28 (1,7) P < 0.001
Ácido butanoico	II	-4,76 (0,38) P < 0.001	fixado	fixado	177,48 (2,66) P < 0.001
Butanoato de etila	I	-3,09 (0,18) P < 0.001	fixado	fixado	269,22 (7,12) P < 0.001
Butanoato de etila	II	-2,93 (0,17) P < 0.001	fixado	fixado	271,78 (6,93) P < 0.001

^w b , indica o coeficiente de inclinação da curva de dose-resposta.

^x c e d são assíntotas inferiores da curva de dose-resposta (fixadas em 0 para todos os modelos) e superiores fixadas e 0.8; 0.85 e 0.95 para o ác. Butanoico (ensaio II) e butanoato de etila (ensaios I e II).

^z e , corresponde a dose necessária para causar 50% de mortalidade da população.

* entre parênteses o erro padrão e o valor de P para os parâmetros.

Observaram-se nos dois ensaios realizados padrões similares de resposta dos J2 aos compostos estudados (Figura 1). O ácido butanoico causou mortalidade em 50% da população dos J2 de *M. javanica* em concentração 35% inferior ao butanoato de etila variando de 175,28 a 177,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o butanoato de etila teve a CL_{50} de 269,22 e 271,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 5).

Tabela 5. Doses que resultaram em 50% de mortalidade da população de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* (CL_{50})

Composto	Ensaio	CL_{50} (ppm) ^z predito pelo modelo
Ácido butanoico	I	175,28 (171.94 – 178.63)
Ácido butanoico	II	177,48 (172.25 – 182.71)
Butanoato de etila	I	269,22 (255.25 – 283.19)
Butanoato de etila	II	271, 78 (258.20 – 285.37)

^z Intervalo de confiança, 95% para cada CL_{50} incluso entre parênteses

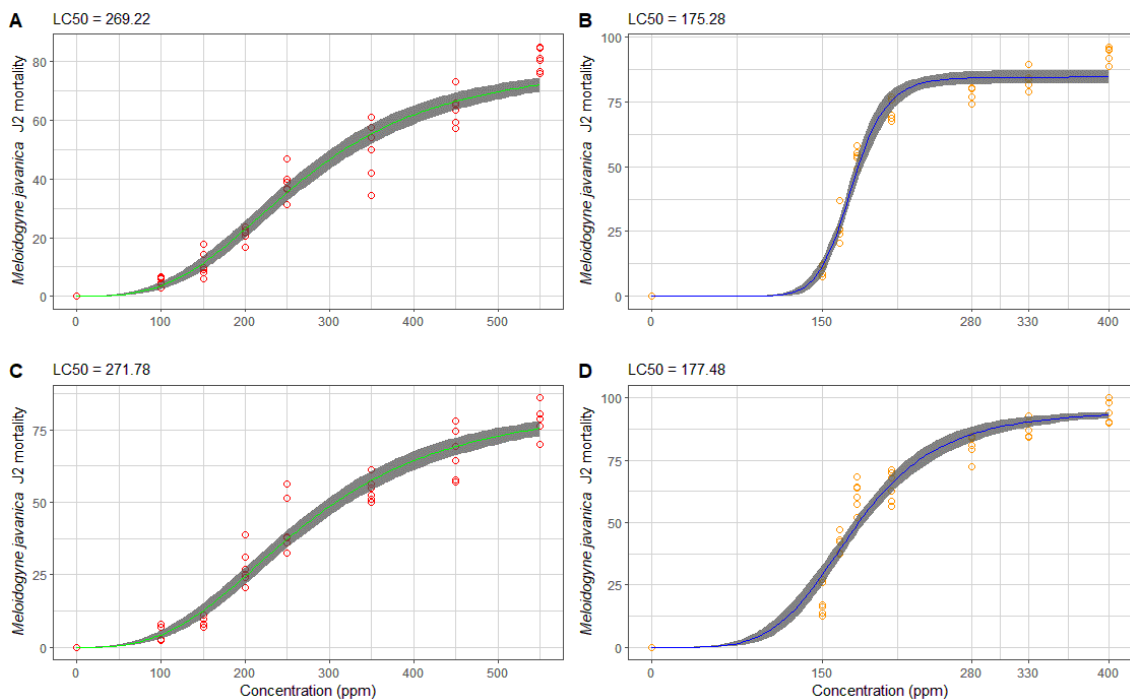


Figura 1. Curva de dose-resposta de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* expostos a compostos com atividade nematicida. Os J2 de *M. javanica* foram expostos, por 48 h, a diferentes concentrações dos compostos butanoato de etila (A e C) e ácido butanoico (B e D). As curvas de dose-resposta foram determinadas usando modelo logístico. Os círculos sem preenchimento indicam os dados brutos coletados em cada unidade experimental. O intervalo de confiança de 95% é representado pela região sombreada ao redor da curva.

4.5 Fumigação com ácido butanoico e butanoato de etila no controle de *M. javanica* em tomateiros em casa de vegetação

A aplicação de butanoato de etila ou ácido butanoico nas doses de 0,5 e 1 mL causou redução significativa no número de galhas por sistema radicular de tomateiro, em comparação com o controle negativo (água), representados no gráfico pelos pontos próximos a linha de zero. No entanto o butanoato de etila foi significativamente mais eficaz na redução de galhas. Contudo a aplicação dos dois compostos, na dose de 0,2 mL, não afetou o número de galhas, comparado ao controle negativo. Nas plantas cultivadas em substrato que receberam a aplicação de dazomete na dose de 0,25 g não se observou a presença de galhas (Figura 2).

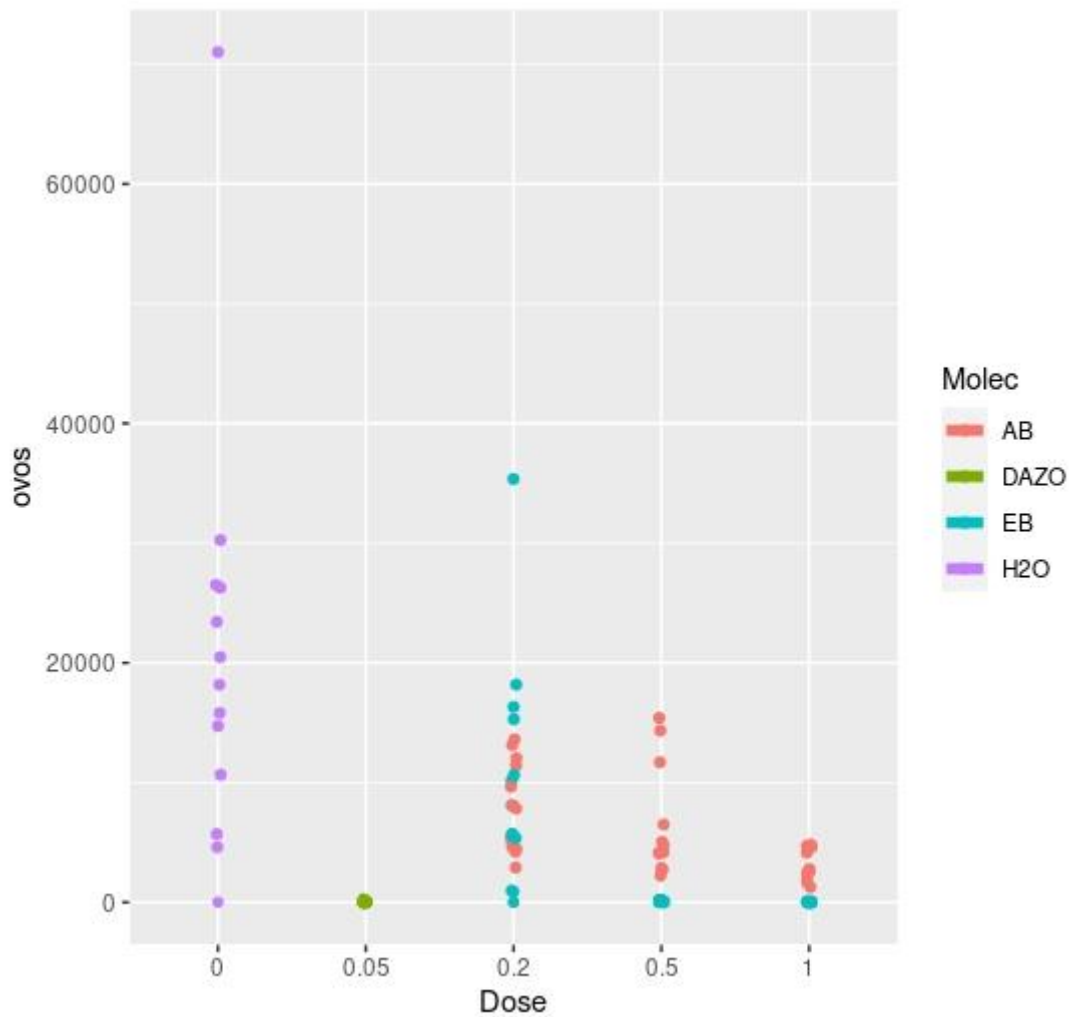


Figura 3. Número de ovos nos sistemas radiculares de tomateiro cultivado em substrato infestado com ovos de *Meloidogyne javanica* após a fumigação com os compostos ácido butanoico (AB) e butanoato de etila (EB) nas doses de 0,2, 0,5 e 1 mL. A nematicida comercial Basamid (DAZO) foi utilizado como controle positivo. Os pontos coloridos representam os dados preditos pelo modelo para cada unidade amostral de cada tratamento.

As aplicações de butanoato de etila e ácido butanoico na concentração de 0,2 mL não afetaram a reprodução do nematoide, sendo similar ao controle negativo (água). O ácido butanoico tem eficácia inferior à do butanoato de etila.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm demonstrado que tanto resíduos vegetais quanto aqueles derivados de laticínios emitem uma vasta gama de moléculas voláteis, dentre as quais, muitas com atividade nematicida contra *Meloidogyne* spp. (SIQUEIRA et. al., 2021; GOMES et. al., 2020; SILVA et. al., 2019). O presente estudo comprovou a toxicidade do resíduo líquido da industrialização de mandioca pela emissão de moléculas voláteis tóxicas aos J2 de *M. javanica*.

De fato, desde o século passado estudos indicavam o potencial da manipueira como uma alternativa para o controle de fitonematoides (PONTE et al. 1987; FRANCO et al., 1990). De acordo com Nasu et al., 2015 em solo infestado com *M. incognita*, a aplicação da manipueira a partir da diluição de 10 % em água (v/v) é altamente eficiente em reduzir a população do nematoide nas raízes de tomateiro, além de contribuir positivamente com o aumento de peso dos frutos e da massa seca da parte aérea das plantas. Por conter na sua composição diversos nutrientes como nitrogênio, potássio, fósforo e cálcio, a manipueira pode atuar como um fertilizante (Nasu et al., 2015), o que justifica o seu uso na redução de populações de fitonematoides. Porém nas doses recomendadas sua aplicação em grandes lavouras é dificultada. Adicionalmente, a atividade nematicida da manipueira está relacionada principalmente com a presença de compostos cianogênicos, originados da associação de compostos glicosídeos e a enzima linamarase formando ácido cianídrico e cianeto livre, ambos de caráter ácido e tóxico (POULTON, 1990; NASSAR, 2000). DOUDA et al., 2015 relataram que a exposição de *Bursaphelenchus xylophilus* ao ácido cianídrico na dose de 12,30 g/m³ resultou em 100 % de mortalidade após 8 h de exposição.

A reduzida capacidade das fêmeas resultantes da inoculação de J2 expostos ao volatiloma da manipueira indica efeitos deletérios das moléculas voláteis, nos processos fisiológicos do J2, que levam a reprodução. A redução da capacidade reprodutiva dos fitonematoides após exposição aos voláteis emitidos por resíduos orgânicos já tem sido relatado em extratos vegetais e resíduos vegetais (SILVA et. al., 2018)

Oito moléculas foram identificadas por SPME-CG-MS no volatiloma da manipueira, cinco álcoois e dois ácidos carboxílicos. A presença delas pode ser resultante do processo de fermentação intermediado por microrganismos que produzem enzimas amilolíticas e ácidos orgânicos (CERADA, 1987). O butanoato de etila, um éster, também presente, pode ser sintetizado a partir do etanol e do ácido butanoico, porém necessita do ácido sulfúrico como catalizador (Yancheng Chunzhu Spice Limited Company, 2015). No entanto a levedura *Geotrichum* sp isolada da manipueira também é capaz de produzir este éster (PASTORE, 1994). Na fase orgânica obtida a partir do filtrado da fermentação da manipueira em mistura com esterco de galinhas, Q. Lu et al., (2020) identificaram através CG o palmitato de metila e estearato de metila que repeliram os J2s, e inibem a eclosão; reduzem as galhas, massas de ovos e J2 no solo além de regular, negativamente, os genes de ligados ao parasitismo (Mi-flp-18 e 16D10).

O etanol detectado no volatiloma da manipueira é conhecido por sua atividade nematicida, causando a morte e reduzindo a eclosão de J2 de *M. incognita* (SILVA et al., 2016). Além disso, o etanol apresenta efeitos tóxicos a *Heterodera glycinis* tanto em contato direto como em fumigação, podendo a sua aplicação ter uso prático para o controle do nematoide dos cistos (PEDROSO et.al., 2020). As demais moléculas também presentes como o Butan-1-ol, Butan-2-ol, Propan-1-ol e Propan-1-ol são álcoois comuns, porém sem registro da toxicidade em fitonematoides. Contudo o ácido acético também presente no volatiloma da manipueira em contato por 24 horas com J2 de *M. incognita*, apresentou CL₅₀ de 192,95 µL mL⁻¹ (SIQUEIRA et. al., 2021). No presente estudo, a intensidade deste composto na manipueira foi baixa, assim como também foi detectado em baixa intensidade por Demiate e seus colaboradores (1999).

O ácido butanoico (ácido butírico) foi o composto identificado com maior intensidade no volatiloma da manipueira. Este composto é um ácido carboxílico de cadeia curta, amplamente utilizado na indústria química, alimentícia e farmacêutica, emitindo um odor forte, similar ao do queijo. Sua CL₅₀ para J2 de *M javanica* variou entre 175,28 µL mL⁻¹ e 177,48 µL mL⁻¹. Em estudo conduzido com diversos ácidos graxos, o ácido butanoico a 0,15% reduziu de forma significativa a reprodução de *M. incognita* (ZHANG et. al., 2012; FAN et. al., 2014).

No estudo de fumigação com ácido butanoico a dose de 200 µL não diferiu da testemunha, porém houve redução no número de galhas e ovos no sistema radicular na dose de 1000 µL, sendo necessário mais estudos sobre esse composto em campo.

O butanoato de etila também encontrado no volátiloma da manipueira, é um éster de cadeia curta com aroma de abacaxi, geralmente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, com solubilidade em etanol e éter. Os valores de CL₅₀ para J2 de *M. javanica* calculados em dois ensaios foram de 269,22 µL mL⁻¹ e 271,78 µL mL⁻¹. Outros ésteres possuem ações nematicida como o pelargonato de metila, um éster metílico de um ácido graxo, eficaz no controle de *H. glycines* e *M. incognita* em soja (DAVIS et. al., 1997).

A fumigação de substrato em casa de vegetação com butanoato de etila na dose de 500 e 1000 µL reduziu drasticamente o número de ovos e J2 e seu potencial em campo está sendo estudado em campo na cultura da alface.

6 CONCLUSÕES

- O volátiloma da manipueira apresentou compostos tóxicos a J2 de *M. javanica*;
- A reprodução das fêmeas de *M. javanica* foi reduzida após J2 serem expostos por 24 horas aos COVs emitidos pela manipueira;
- Oito moléculas foram identificadas no volátiloma da manipueira
- Ácido butanoico e butanoato de etila causaram a morte significativa dos J2 de *M. javanica* e apresentaram CLs₅₀ de 176 e 270 µg mL⁻¹ respectivamente;
- As fumigações com ácido butanoico e butanoato de etila em substrato infestado de ovos de *M. javanica* foram eficazes no controle e causaram reduções significativas na população de *M. javanica* em tomateiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD P, GOUZY J, AURY JM, CASTAGNONE-SERENO P, DANCHIN EG, et al.. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Nature Biotechnology*, New York, v. 26, n. 8, p. 909 – 915. 2008.
- 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.
- AUGUSTO, F. Cromatografia a gás: curso em diapositivos. *Chemkeys*, Liberdade para Aprender, Campinas, p. 10, jul. 2000. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografia-a-gas-curso-em-diapositivos/>>. Acesso em: 18 out. 2019
- BARROS, A. F., CAMPOS, V. P.; SILVA, J. C. P.; 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 javanica*. *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 javanica*. *Nematropica* v.44, p. 190-199. 2014b.
- BRADBURY, J. H., CLIFF, J., & DENTON, I. C. (2011). Uptake of wetting method in Africa to reduce cyanide poisoning and konzo from cassava. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 539–542
- BEZERRA, M. G. S., SILVA, G. G. C., DIFANTE, G. S., EMERENCIANO NETO, J. V., OLIVEIRA, E. M. M., & OLIVEIRA, L. E. C. (2017). Cassava wastewater as organic fertilizer in 'Marandu' grass pasture. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21, 404–409.
- 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.
- CARDOSO, A. P., MIRIONE, E., ERNESTO, M., MASSAZA, F., CLIFF, J., HAQUE, M. R., & BRADBURY, J. H. Processing of cassava roots to remove cyanogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 451–460, 2005
- CASTRO, A. G. Defensivos agrícolas como um fator ecológico. *Jaguariúma: EMBRAPA – CNPDA* (documento, 6) 20 p. 1989.
- CEREDA, M. P.; LOPES, A. M. Determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca. *Anais do V SLACA*, Campinas-SP, 2003.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Sept. 2002.
- COMERLATO, A. P. (2009). Efeito de manipueira no controle do nematóide de cisto da soja *Heterodera glycines* Ichinohe. (M.Sc. thesis). Universidade Estadual do Oeste de Paraná, Paraná, Brazil. Retrieved from <http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/1365/1/Anna%20Paula%20Comerlato.pdf>

- DEMIATE, I.M.; BARANA, A.C.; CEREDA, M.P.; WOSIACKI, G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. *Food Science and Technology* 19, 131-135, 1999
- DUDAREVA, N., KLEMPIEN, A., MUHLEMANN, J. K., KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*. V. 198, p. 16-32. 2013
- 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.
- FERRAZ, S. Summary report on the current status, progress and needs for *Meloidogyne* research in Brazil (Region III). In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Ed.). An advanced treatise on *Meloidogyne*: volume 1: biology and control. Raleigh: North Caroline State University Graphics, 1985. p. 351-352.
- FIORETTO, R. A. (2001). Uso direto da manipueira em fertirrigação. In M. P. Cereda (Ed.), *Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca* (pp. 67–79). São Paulo, Brazil: Fundação Cargill.
- FIORETTO, R.A., 1994. Uso direto da manipueira em fertirrigação. In: Cereda, M.P. (Ed.), *Industrialização da mandioca no Brasil*. Pauliceia, São Paulo, pp. 51e80.
- FRANCO, A., PONTE, J.J., SILVA, R.S., SANTOS, F.A.M. Dosagem de manipueira para tratamento de solo infestado por *Meloidogyne*. *Nematologia Brasasileira*, v. 15, 25 a 32, 1990
- FREIRE, E.S.; CAMPOS, V.P.; OLIVEIRA, D.F.; et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne javanica* and potentially fungi for nematode control. *Journal of Nematology*, v. 44, p. 321-328, 2012.
- GU, Y. Q., ZHOU, J. P., ZOU, C. S., MO, M. H., & ZHANG, K. Q. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.
- HOWELER, R., LUTALADIO, N., & THOMAS, G. (2013). *Save and grow: Cassava. A guide to sustainable production intensification*. Rome, Italy: FAO.
- HUANG, Y.; XU, C.; MA, L.; ZHANG, K. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Pathology*, v. 126, p. 417-422, 2010.
- 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.
- ISIDOROV, V. & JDANOVA, M. Volatile organic compounds from leaves litter. *Chemosphere*, Davis, v. 40, n. 9, p. 975-979, 2002.
- LEFF, J.W. & FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 1629-1636, 2008.
- LIMA, A. O. Biofumigação do solo com *Brassica rapa* para o controle de fitonematoides. 2006. 44 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- MAGALHÃES, C. P., XAVIER FILHO, J., & CAMPOS, F. A. P. Biochemical basis of the toxicity of manipueira (liquid extract of cassava roots) to nematodes and insects. *Phytochemical Analysis*, 11,57–60, 2000.

MONTAGNAC, J. A., DAVIS, C. R., & TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8,181–194, 2009.

NASSAR, N. M. A. Wild cassava, *Manihot* spp.: Biology and potentialities for genetic improvement. *Genetics and Molecular Biology*, 23,201–212, 2000.

NASU, É. G. C. (2008). Composição Química da Manipueira e sua Potencialidade no Controle de *Meloidogyne javanica* em Tomateiro no Oeste do Paraná. (M.Sc. thesis). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, Brazil. Retrieved from http://tede.unioeste.br/bitstream/tese/1338/1/Erica_Nasu_2008

NASU, É. G. C., FORMENTINI, H. M., & FURLANETTO, C. Effect of manipueira on tomato plants infected by the nematode *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, 78, 193–197, 2015.

NASU, É. G. C., PIRES, E., FERMENTINI, H. M., & FURLANETTO, C. Efeito de manipueira sobre *Meloidogyne javanica* em ensaios in vitro em tomateiros em casa de vegetação. *Tropical Plant Pathology*, 35,32–36, 2010.

NAYLOR, R.L., LISKA, A.J., BURKE, M.B., FALCON, W.P., GASKELL, J.C., ROZELLE, S.D., CASSMAN, K.G. The ripple effect: biofuels, food security, and the environment. *Environ. Sci. Pollut. Sustain. Dev.* 49 (9), 30–43, 2007.

NWEKE, F. I., SPENCER, D. S. C., & LYNAM, J. K. The cassava transformation. Africa's best kept secret East Lansing, MI: Michigan State University Press, 2002.

NICOL J. M., TURNER S. J. COYNE D. L, NIJS L. DEN, HOCKLAND, S.; TAHNA MAAFI Z. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (eds). *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer, Dordrecht, 21-43, 2011. DOI: 10.1007/978-94-007-0434-3_2.

NUNES, H. T. Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP 75 p, 2008.

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.

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 javanica*. *Pest Management Science*. v.75, p. 476-483. 2019.

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

PONTE, J.J. Uso da Manipueira Como Insumo Agrícola: defensivo e fertilizante. In: Cereda, M.P. (Ed.), *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. Fund. Cargill, São Paulo, pp. 80 a 95, 2001.

PONTE, J.J., FRANCO, A. Manipueira, um nematicida não convencional de comprovada pontencialidade Sociedade Brasileira de Nematologia. 5, 25-33, 1981.

PONTE, J.J., FRANCO, A., PONTES, A.E.L. Estudo sobre a utilização da manipueira, como nematicida, em condições de campo. *Nematologia Brasilsleira*. 11, 42 a 47, 1987

- PONTE, J. D., FRANCO, A., & SANTOS, J. H. R. D. Teste preliminar sobre a utilização da manipueira como inseticida. *Revista Brasileira de Mandioca*, 7,89–90, 1988.
- PONTE, J. D., TORRES, J., & FRANCO, A. Investigações sobre uma possível ação nematicida da manipueira. *Fitopatologia Brasileira*, 4, 431–434, 1979.
- OKA Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments. A review. *Appl Soil Ecol.* 44:101-115, 2010
- RIGA, E.; LACEY, L.A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control*, v. 45, p. 380-385, 2008.
- RODRÍGUEZ-KABANA, R.. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *Journal of Nematology* 18, 120–135, 1986.
- POULTON, JONATHAN E., Cyanogenesis in Plants. *Plant Physiology*, v.94, 401 – 405,1990
- SANTOS, A. Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microregião sudoeste da Bahia-Brasil. In J. L. Luzón & M. Cardim (Eds.), *Problemas Sociales y Regionales en América Latina: Estudio de Casos* pp. 11–25, 2009.
- SANTOS, A., & PONTE, J. D. Ação fungicida da manipueira no controle de oídio. *Fitopatologia Brasileira*, 18, S302, 1993.
- SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role on the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. *Vistas on Nematology*. Hyattsville: Society of Nematologists, p. 7-14, 1987
- SASSER, J. N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease*, Washington, v. 64, n. 1, p. 36-41, Jan. 1980.
- SIKORA, R. A.; FERNANDEZ, E. Nematodes parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). *Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2nd ed. Wallingford: Cabi, p 319-392, 2005.
- 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.
- SIQUEIRA, M. G. S., Campos, V. P., Terra, W. C., Magalhães Pacheco, P. V., Lopes de Paula, L., Barros, A. F., & Pedroso, M. P. Volatile fatty acids from whey volatillome as potential soil fumigants to control *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 143, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105567>
- SOUZA, S. O., OLIVEIRA, L. C., CAVAGIS, A. D. M., & BOTERO, W. G. (2014). Cyanogenic residues: Environmental impacts, complexation with humic substances, and possible application as biofertilizer. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225 - 2223, 2014.
- TIHOHOD, D. Guia prático para identificação de fitonematóides. Jaboticabal: FCA/FAPESP. p. 67, 1997.
- TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.N.; BROADBENT, P. Diseases of Citrus. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). *Diseases of tropical fruit crops*. London: CAB International. p.197-226, 2003.
- UBALUA, A. O. Cassava wastes: Treatment options and value addition alternatives. *African Journal of Biotechnology*, 6, 2065–2073, 2007

VIETES, R. L., & BRINHOLI, O. Efeito da manipueira, em condições de campo, na emergência de brotos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e no controle de plantas daninhas. *Energia na Agricultura*, 9, 28–33, 1994.

VILLAIN, L.; SALGADO S. M. L.; TRINH, P.Q. Plant Nematode Parasites of Coffee and Cocoa. In *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 3.; Sikora, R.A.; Coyne, D.; Hallmann, K.; Timper, P., Eds.; CABI: Wallingford, United Kingdom, 2018.

WORLDTLAS. (2017). Top cassava producing countries in the world. Retrieved from <https://www.worldatlas.com/articles/top-cassava-producing-countries-in-the-world.html> Wosiacki, Acesso em: 22 out. 2019