



MAYSA SIQUEIRA GONÇALVES DA SILVA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DO SORO DE LEITE
SÃO TÓXICOS A *Meloidogyne incognita***

**LAVRAS – MG
2020**

MAYSA SIQUEIRA GONÇALVES DA SILVA

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DO SORO DE LEITE SÃO TÓXICOS A
Meloidogyne incognita

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

da Silva, Maysa Siqueira Gonçalves.

Compostos orgânicos voláteis de soro de leite no controle de
Meloidogyne incognita / Maysa Siqueira Gonçalves da Silva. -
2020.

34 p.: il.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Coorientador(a): Aline Ferreira Barros, Willian César Terra.

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

Bibliografia.

1. Fumigação. 2. Bioprospecção de moléculas. 3. Resíduos
líquidos. I. Campos, Vicente Paulo. II. Barros, Aline Ferreira. III.
Terra, Willian César. IV. Título.

MAYSA SIQUEIRA GONÇALVES DA SILVA

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE SORO DE LEITE 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 01 de julho de 2020

Dr. Marcio Pozzobon Pedros
Dr. Eduardo Souza Freire

DQI/ UFLA
Universidade de Rio Verde (UniRV)

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

LAVRAS - MG
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser A Força que me move, Ao Espírito Santo o Verdadeiro Guia de toda jornada.

A toda família agradeço o infinito apoio. Em especial minha avó Joaquina Siqueira, avô Jorge Gonçalves e minha mãe Janeide Siqueira por estarem sempre ao meu lado, independentemente da distância. A Thatyana Siqueira agradeço a eterna irmandade, ao Tio Sandro Siqueira agradeço o incentivo, a Tia Valéria Siqueira por ser meu exemplo e inspiração profissional e pessoal e ao meu pai Maynard Alves, agradeço.

Aos pequeninos Carolina Siqueira e Antônio Siqueira agradeço por alegrar os meus dias com o sorriso, inocência e doçura de criança.

A Família que o Plano Divino colocou em minha vida, Angélica Maia, Eduardo Souza Freire e José Carlos Padilha eterna gratidão pelo acolhimento, amparo e conselhos, vocês estarão eternamente em meu coração.

Aos Amigos de caminhada Juliana Ramos, Jessica Brasau, Leticia Lopes de Paula e Paulo Victor Pacheco agradeço ao companheirismo e momentos únicos vividos.

A toda equipe do laboratório de nematologia agradeço pela cumplicidade nos trabalhos, em especial ao Professor Vicente Paulo Campos pela orientação e toda transmissão de conhecimento, bem como Aline Barros e Willian Terra pela coorientação e parceria.

Agradeço a toda banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao Departamento de Fitopatologia minha eterna gratidão.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras (UFLA) por acolher-me como uma mãe acolhe um filho.

A FAPEMIG por fomentar toda a pesquisa, agradeço.

Meu muito OBRIGADA A TODOS!!!

*Fazer a si mesmo perguntas mais profundas revela novas maneiras de estar no mundo. Traz um sopro de ar fresco. Torna a vida mais alegre. **A grande jogada da vida não é saber, mas mergulhar no mistério.***

FRED ALAN WOLF

RESUMO

Tem sido comprovada a eficácia dos descartes da agroindústria no controle de fitonematoides. Um exemplo é o soro de leite, que consiste em um descarte dos laticínios. Como este controle opera no campo, ainda não foi completamente entendido muito menos o papel dos compostos voláteis na toxicidade. No presente trabalho as emissões do soro de leite causaram elevada imobilidade a juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Nelas foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) 27 moléculas pertencentes aos grupos químicos: éster; álcool e ácido carboxílico. Dentre elas, foram selecionadas quatro para testes de eficiência contra ovos e J2 de *M. incognita*. Os compostos ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila apresentaram concentração letal média (CL50) de 192, 95, 236,08, 134,30, 226,10, respectivamente, aos J2 de *M. incognita*. Em teste *in vitro* essas moléculas reduziram significativamente ($P < 0,01$) a eclosão de J2 de *M. incognita*, com maior eficácia para os compostos octanoato de etila e ácido acético, que causaram redução de 88,7% e 84,7%, respectivamente, em relação ao controle negativo. Estes dois compostos, quando aplicados ao substrato infestado com ovos de *M. incognita*, reduziram a infectividade em 95,68 e 93,24% e reprodução em 99,34 e 92,73% comparada ao controle negativo. A aplicação de octanoato de etila causou redução no número de ovos a valores similares ($P < 0,05$) ao controle positivo (Basamid). As moléculas octanoato de etila e ácido acético apresentaram perspectivas boas como candidatas a nematicidas para o agronegócio após novas pesquisas.

Palavras-chave: Fumigação. Bioprospecção de moléculas. COVs. Resíduos líquidos.

ABSTRACT

The efficacy of agro-industry discards in controlling phytoomatoids has been proven. An example is whey, which consists of a disposal of dairy products. As this control operates in the field, it has not yet been fully understood, much less the role of volatile compounds in toxicity. In the present study, whey emissions caused high immobility to juveniles of the second stage (J2) of *Meloidogyne incognita*. In them were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) 27 molecules belonging to the chemical groups: ester; alcohol and carboxylic acid. Among them, four were selected for efficiency tests against eggs and *M. incognita* J2. The compounds acetic acid, isovaleric acid, octanoic acid and ethyl octanoate had an average lethal concentration (LC50) of 192, 95, 236.08, 134.30, 226.10, respectively, at J2 of *M. incognita*. In an in vitro test, these molecules significantly reduced ($P < 0.01$) the outbreak of J2 of *M. incognita*, with greater efficiency for the compounds ethyl octanoate and acetic acid, which caused a reduction of 88.7% and 84.7%, respectively, in negative control. These two compounds, when applied to the substrate infested with *M. incognita* eggs, reduced infectivity by 95.68 and 93.24% and reproduction by 99.34 e 92.73% compared to the negative control. The application of ethyl octanoate caused a reduction in the number of eggs to values similar ($P < 0.05$) to the positive control (Basamid). The molecules ethyl octanoate and acetic acid showed good prospects as candidates for nematicides for agribusiness after further research.

Keywords: Fumigation. Bioprospecting of molecules. VOCs. Liquid waste

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Aspectos gerais dos nematoides	12
2.2 Estratégias de controle	13
2.3 Subprodutos da agroindústria	15
2.4 Utilização de descartes da industrialização de leite no controle de fitopatógenos.....	15
3. MATERIAL E METODOS.....	17
3.1 Obtenção de inóculo de nematoides e do soro de leite	17
3.2 Toxicidade dos COVs emitidos pelo soro de leite a <i>M. incognita</i>	17
3.3 Caracterização de COVs produzidos pelo soro de leite	18
3.4 Concentração letal média (CL50) a J2 de <i>M. incognita</i> dos principais compostos orgânicos voláteis presentes no soro de leite	19
3.5 Toxicidade de moléculas das emissões do soro de leite a ovos de <i>M. incognita</i>	19
3.6 Efeito da fumigação de substrato com ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanoico ou octanoato de etila na infectividade e reprodução <i>M. incognita</i>	20
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5 RESULTADOS.....	21
5.1 Exposição de <i>M. incognita</i> aos COVS do soro de leite	21
5.2 Caracterização de COVs produzidos pelo soro de leite	22
5.3 Toxicidade de moléculas encontradas no soro de leite a J2 de <i>M. incognita</i>	23
5.4 Toxicidade de moléculas encontradas no soro de leite a ovos de <i>M. incognita</i>	23
5.5 Efeito da fumigação com ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila na infectividade e reprodução <i>M. incognita</i>	24
6 DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÕES	29

1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoides são patógenos de solo de difícil controle, que têm afetado a produção agrícola mundial, provocando perdas anuais estimadas entre US\$ 100 a 157 bilhões (SINGH et al., 2013). Em especial nas hortaliças, estima-se que os fitonematoides causem 11% de redução na produção mundial (RAO et al., 2016). No Brasil as perdas atingem R\$ 16,2 bilhões segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN, 2019). Os principais nematoides de ocorrência em hortaliças pertencem ao gênero *Meloidogyne*, provocando danos qualitativos em cenoura, beterraba, rabanete e mandioquinha salsa. Também causam perdas na produtividade de alface, tomate, pimenta, pimentão, berinjela, jiló e cucurbitáceas (PINHEIRO, 2017).

O gênero *Meloidogyne* é um parasita obrigatório e está em todas as regiões agrícolas do mundo (TRUDGILL; BLOK, 2001). Entre as culturas atacadas por *Meloidogyne* spp. a cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das que sofrem danos mais severos, com reflexos no crescimento e produção, predispondo a planta a sofrer ataques de outros patógenos gerando perdas qualitativas (NICOL et al., 2011).

Os danos causados pelos fitonematoides estão ligados principalmente a interação entre o ambiente favorável, hospedeiro suscetível e o patógeno agressivo e virulento apenas em condições favoráveis o patógeno se reproduz e causa danos (BERGAMIN FILHO, 1995).

A rotação de cultura é uma das melhores alternativas para reduzir a população dos fitonematoides desse gênero no solo. Entretanto, em hortaliça a limitação em cultivares resistentes ou culturas com baixo fator de reprodução inviabilizam a prática (KHAN et al., 2015).

Outras ferramentas de manejo da população abaixo do nível de dano econômico, utilização de cultivares resistentes, alqueive, controle químico e biológico entre outros (BARKER; KOENNING, 1998; MACHADO A, C.; KANEKO L; PINTO Z. V., 2016). Apesar do controle químico ser a alternativa mais utilizada, existem alguns inconvenientes no seu uso como, custo elevado, risco de poluição ao meio ambiente, e residual deixado nos alimentos (DONG; ZHANG, 2006; SUASSUNA N.; SCOZ L. B.; GIBAND M., 2016; LEONETTI et al., 2017), se aplicado sem a devida assistência técnica e sem o devido respeito quanto as doses e períodos de carência.

Diante do cenário nos últimos anos, o controle biológico tem sido enfatizado no manejo de fitonematoides (LUCON et al., 2014). Dentre os diversos mecanismos de ação de

um agente de biocontrole, destacam-se os compostos orgânicos voláteis (COVs). Constituem-se de uma molécula com até 20 átomos de carbono, podendo ser produzidos por plantas (DUDAVERA et al., 2006) e microrganismos (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010), além de participarem na química atmosférica, processos biológicos do solo e interações bióticas (LEFF: FIEPER, 2008). Os COVs podem atravessar facilmente as porosidades do solo, se disseminando e atuando nos microrganismos próximos e distantes do local de produção, aumentando assim a área de atuação. Os COVs tornam-se assim uma alternativa de controle de patógenos de solo (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

Arelado ao controle biológico a incorporação de matéria orgânica ao solo é uma prática utilizada com sucesso por agricultores (OKA et al., 2000). São várias as possíveis fontes de matéria orgânica com aplicação no manejo de fitopatógenos, incluindo os resíduos da industrialização de produtos vegetais e animais. Quando incorporadas ao solo podem ter efeito nematicida. A torta de mamona e de algodão incorporadas ao solo liberam COVs tóxicos a *M. incognita* (ESTUPIÑAN et al., 2017; PEDROSO et al., 2019). O soro de leite é um resíduo da indústria de laticínios e apresenta toxicidade, causando inibição na eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. exigua* (SALGADO; CAMPOS, 2003). O envolvimento de moléculas voláteis nesta capacidade nematicida do soro de leite ainda não foi esclarecido. Desta forma, buscou-se avaliar a capacidade tóxica do soro de leite a J2 de *M. incognita*. Constatada a presença de moléculas tóxicas a J2 de *M. incognita* nas emissões do soro de leite, serão caracterizadas as moléculas incidentes e escolhidas algumas delas para o cálculo da concentração letal média (CL50) e estudo de eclosão e fumigação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais dos nematoides

Os nematoides constituem organismos multicelulares mais abundantes em todo mundo, com aproximadamente de 100 milhões de espécies. Dentre eles estão os fitonematoides que são responsáveis por grandes prejuízos agrícolas. Esses patógenos foram durante muitos anos, negligenciados ou até confundidos com outros fatores como deficiência nutricional e déficit hídrico (SASSER; FRECKMAN 1987; VIGLIERCHIO, 1991; TIMMER et al., 2003).

Estima-se que existam aproximadamente 4100 espécies de fitonematoides que causam cerca de 12% de perdas na agricultura mundial (WEISCHER; BROWN, 2001; DECRAEMER & HUNT, 2006). As maiores delas são atribuídas ao gênero *Meloidogyne* spp., devido a sua ampla gama de hospedeiros (JONES et al., 2013).

O gênero *Meloidogyne* começou a ganhar importância em 1855 na Inglaterra onde teve seu primeiro relato, em raízes de pepino. Uma década mais tarde foi relatado no estado do Rio de Janeiro por Goeldi associado a raízes de café, constituindo no primeiro relato do fitonematoide no Brasil (FERRAZ & BROWN, 2016).

Meloidogyne spp. são endoparasitas sedentários com reprodução partenogenética. Seu parasitismo tem início com a penetração do juvenil de segundo estágio (J2), na extremidade da raiz onde fica o tecido meristemático. Posteriormente, o nematoide move-se pelos tecidos indiferenciados do meristema chegando na zona de diferenciação celular, até definir o local adequado onde estabelecerá o sítio de alimentação, que estará normalmente na endoderme periciclo ou parênquima adjacente (CASTAGNONE-SERENO, 2006).

A nutrição dos J2 ocorre por meio do grupo de 4 a 6 células gigantes, formadas poucas horas após a injeção de secreções salivares das glândulas esofagianas nas células parasitadas, induzindo hipertrofia e multinucleação (FERRAZ & BROWN, 2016).

As condições climáticas ideais para o estabelecimento de *Meloidogyne* se resumem no clima tropical onde as condições de temperatura e umidade favorecem sua reprodução (FERRAZ, 1999). No entanto, muitas espécies foram adaptadas ao clima temperado como *M. hapla*.

Os sintomas de uma planta infestada pelo gênero *Meloidogyne*, podem ser diretos como a formação de galhas, redução no volume do sistema radicular, deslocamento cortical ou descortiçamento, digitamento e rachaduras. Ou sintomas reflexos que são plantas de

tamanho desigual ocorrência em reboleiras, deficiência nutricional, murchamento, desfolha, mudanças nas características varietais e diminuição na produção (AMORIM; REZENDE; FILHO, 2018).

Existe uma grande dificuldade em estabelecer meios de controle eficientes contra *Meloidogyne* spp.. O uso de cultivares resistentes é o método de controle ideal, no entanto, o mercado não dispõe de cultivares com tais características para a maioria das culturas de importância econômica, conseqüentemente o controle químico e biológico são sempre procurados pelos agricultores (RODRIGUES et al, 2003).

Com poucas opções no grupo químicos dos nematicidas químicos no mercado; além do alto custo, alta toxicidade, risco a organismos benéficos e ao meio ambiente; o controle biológico e alternativo passa a ser boas opções no manejo de fitonematoides (FRANZENER, 2007).

2.2 Estratégias de controle

No passado o controle de fitonematoides tinha como alicerce a utilização de um único método ou técnica. Hoje se prioriza a utilização de técnicas combinadas, o chamado manejo integrado de nematoides (MIN), sendo as mais utilizadas atualmente o controle varietal (plantio de variedades/ cultivares resistentes ou tolerantes), rotação de culturas e controle químico ou biológicos ambos com ação nematicida (AMORIM; REZENDE; FILHO., 2018).

O controle varietal consiste na utilização de variedades ou cultivares que previnem ou restringem a reprodução de fitonematoides. Esse tipo de estratégia visa controlar principalmente os nematoides de galhas e cistos (ABAD et al., 2003).

A resistência varietal pode ocorrer de forma natural baseando-se em genes presentes tanto na cultura quanto em outras formas selvagens, podendo ser ativa quando a planta tem habilidade em reagir ao parasitismo por mecanismo de defesa, ou passiva que ocorre independente do parasitismo por fitonematoides. Esse tipo de resistência geralmente ocorre devido a presença de substâncias repelentes ou tóxicas a fitonematoides. A outra forma de resistência é a efetiva controlada por genes com dominância total ou parcial. A herança pode ser poligênica ou recessiva, cujos genes produzem efeitos com ação independente ou associadas (FERRAZ & BROWN, 2016).

A rotação de cultura é uma medida de controle que requer a identificação correta da raça ou espécies do fitonematoide para a seleção da cultivar a plantar e a necessidade de

alternância com plantio de culturas não suscetíveis, após o plantio da resistente. No entanto, existe um entrave na aplicação da prática quando ocorrem misturas de espécies e raças em um mesmo campo de cultivo. Além disso, cultivares com vários genes de resistência são raros ou inexistentes (SILVA & CARNEIRO, 1992).

O controle químico é uma medida de controle que teve início na Europa. As primeiras substâncias utilizadas eram esterilizantes aplicadas no solo. Os primeiros resultados promissores foram com bissulfeto de carbono e cloropricrina. Em 1930 foi inserido no mercado o brometo de metila com ação fumigante. O surgimento desses produtos aliados a outros fumigantes representou um avanço no controle de fitonematoides durante 60 anos. Mas em 1980 muitos desses produtos fumigantes, devido a sua toxicidade e prejuízos a camada de ozônio, tiveram sua comercialização proibida (FERRAZ & BROWN, 2016), surgindo então os residuais.

Apesar de o controle químico ser uma alternativa contra os fitonematoides, seu uso é restrito devido à escassez de produtos registrados no mercado para campo. Atualmente, o Brasil tem dois princípios ativos registrados para o controle de *M. incognita* em tomateiros, a abamectina e fenamufós (AGROFIT, 2019). Ao longo do tempo, muitas moléculas perderam seus registros e observa-se uma escassez de novas para o agronegócio.

Diante do presente cenário, o controle biológico e a prospecção de moléculas advindas de resíduos da indústria constituem alternativa promissora no manejo de fitonematoides. O controle biológico consiste na utilização de microrganismos para eliminar ou reduzir o inóculo, a capacidade ou a atividade patogênica de determinado patógeno à planta. Essa forma de controle pode ocorrer naturalmente ou manipulando o ambiente introduzindo um organismo antagonista (BAKER & COOK, 1974).

Define-se como controle natural quando no agroecossistema existem inimigos naturais que exercem ação de parasitismo ou predação, mantendo baixa densidade populacional do patógeno (BASTOS; TORRES, 2006). Em contrapartida, o controle manipulado ocorre quando é inserido no sistema, plantas hospedeiras geneticamente modificadas com resistência ao patógeno ou, alternativamente, introduz-se organismos antagonistas ao patógeno ali instalado no meio ambiente buscando reestabelecer o equilíbrio no ecossistema (BETTIOL et al., 2008).

2.3 Subprodutos da agroindústria

A utilização de resíduos orgânicos no campo é uma prática comum na agricultura há milhares de anos. Esta prática proporciona diversos benefícios como o aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas, melhoria da estrutura do solo, além do controle de patógenos habitantes de solo (GONZÁLES; CANTO-SAENZ, 1993).

Existem várias fontes de resíduos com potencial no controle de fitonematoides, entre eles, estão os subprodutos da indústria de processamento como dejetos de animais, compostagem e resíduos vegetais (OKA, 2010). A torta de mamona quando incorporada em solos infestados com *M. incognita*, libera COVs que proporcionam imobilidade e morte de J2 de *M. incognita* (PEDROSO et al., 2019). Torta de algodão também apresenta atividade nematicida; quando aplicado nas concentrações de 3% a 6%, reduz a infectividade e a reprodução de *M. incognita* em tomateiro (ESTUPIÑAN-LÓPEZ et al., 2017). Outro subproduto da agroindústria com atividade nematicida é o esterco líquido de porco. Esse subproduto tem na sua composição uma série de ácidos graxos com atividade nematicida contra *Pratylenchus penetrans*. Entre eles estão os ácido acético, *n*-caproico, *n*-valérico e isobutírico (MAHRAN et al., 2008).

Extratos de órgãos vegetais constituem outras fontes com princípios ativos nematicidas os quais têm sido bastante pesquisados nos últimos anos. Folhas de feijão - mucuna (*Mucuna pruriens*), mostarda (*Brassica juncea*), ervilha-pombo (*Cajanus cajan*), neem (*Azadirachta indica*) e feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) causaram toxicidades a J2 de *M. incognita* (BARROS et al., 2014). A incorporação de *Brassica* spp. ao solo é outra prática que reduz populações fitonematoides e fungos fitopatogênicos no solo (STAPLETON & DUNCAN, 1998; NEVES et al., 2007; LORD et al., 2011).

2.4 Utilização de descartes da industrialização de leite no controle de fitopatógenos

O sistema de agricultura denominada orgânica, por não permitir o uso de defensivos agrícolas de origem química, necessita de alternativas no controle de pragas e doenças, sendo os produtos lácteos, uma possível alternativa de controle. O leite cru de vaca em altas doses é um exemplo de controle eficiente de oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) em abobrinha (*Cucurbita pepo*) e pepino (*Cucumis sativus*), mesmo após o início da infecção em campo, superando em eficiência o controle químico (ZATARIM et al., 2005). Os efeitos do leite cru sobre *S. fuliginea* envolvem ações de microrganismos que possivelmente formem um biofilme sob o

tecido foliar impedindo o desenvolvimento da doença e produzindo sais e ácidos com ação fúngica. Pode ainda ocorrer ação indireta pela indução de resistência (BETTIOL et al., 1999). No entanto, as substâncias envolvidas no processo de indução de resistência ainda são desconhecidas.

Alguns estudos têm também relatado a capacidade do soro de leite na inibição da germinação de esporos de *Fusarium graminearum* e da produção de micotoxinas no elenco de atividade antifúngicas contra cepas desse fungo (GAMBA et al., 2016). Outros estudos já evidenciaram também que o soro de leite quando colocado em contato com J2 inibe a eclosão quando em contato com ovos (SALGADO et al., 2003).

Ainda inexistem dados sobre a natureza das moléculas tóxicas a *M. incognita* no soro de leite, principalmente daquelas voláteis.

2.5 Compostos orgânicos voláteis tóxicos a fitonematoides

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são moléculas constituídas de menos de 20 carbonos, como, aldeídos, cetonas, entre outros, hidrocarbonetos (GAMLIEL; STAPLETON, 1993). Em sua maioria esses compostos são líquidos lipofílicos, que se submetidos a alta pressão de vapor, podem atravessar membranas e se dissiparem rapidamente por fluxo de massa no solo (DUDAREVA et al., 2006). Os COVs podem ter diferentes origens como culturas fúngicas (RIGA et al., 2008; FREIRE et al., 2012), bacterianas (GU et al., 2007; HUANG et al., 2010) e vegetais com mais 1.700 moléculas já conhecidas (KNUDSEN et al., 2006).

Tem sido demonstrada a eficiência dos COVs no controle de fungos e fitonematoides principalmente aqueles emitidos por bactérias e fungos advindos de solos agricultáveis (GU et al., 2007; RIGA; LACEY et al., 2008; HUANG et al., 2010; FREIRE et al., 2012). Também COVs de diferentes espécies vegetais como resíduos de mostarda, reduzem a eclosão de J2 de *M. incognita* proporcionalmente às doses aplicadas. Além disso, a incorporação do resíduo melhora a atividade microbiana e estrutura do solo, disponibilizando mais nutrientes para as plantas (LIMA, 2006). A torta de algodão possui também atividade nematicida pela liberação de COVs quando incorporada na concentração de 3%, o que representa 30g/L em campo. Essa dose causa imobilidade e mortalidade de J2, além de reduzir a infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomate plantado em vasos (ESTUPIÑAN-LÓPEZ et al., 2017).

Folhas de citronela (*Cymbopogon nardus*), Pimenta preta (*Piper nigrum* cultivar Cingapura), broto de brócolis (*Brassica oleracea* var. Itálica cultivar Avenger), sementes de

castanhas do Pará (*Bertholletia excelsa*) também emitem COVs, que reduzem a eclosão de J2 de *M. incognita*. Quando água foi exposta às emissões voláteis de brócolis tornou-se tóxica a *M. incognita*. Os COVs emitidos tanto por castanhas do Pará quanto brotos de brócolis mataram J2 e reduziram a infectividade de *M. incognita* em raízes de tomate (DA SILVA et al., 2019).

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Obtenção de inóculo de nematoides e do soro de leite

Uma população pura de *M. incognita* foi multiplicada em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. CV. Santa Clara) e mantida em casa de vegetação por, aproximadamente, dois meses. A confirmação da pureza da população foi feita através da eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001). A seguir, os ovos foram extraídos de raízes que continham galhas, utilizando procedimento padrão descrito por Hussey & Barker, 1973. Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão, utilizando-se o método de funil de Baermann, com peneira de abertura de 25 µm. Os J2 que eclodiam nas primeiras 24 h foram descartados. Para os ensaios utilizaram-se os J2 eclodidos entre 24 h – 72 h após a montagem da câmara de eclosão.

O soro de leite foi fornecido pela empresa de laticínio, Verde Campo[®], sediada na cidade de Lavras, MG, Brasil.

3.2 Toxicidade dos COVs emitidos pelo soro de leite a *M. incognita*

Para este ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Barros et al. (2014) com modificações. Para isso, utilizou-se frascos Sulpelco de 80 x 28 mm (SUPELCOTM SPME, Sigma – Aldrich, Bellefonte, PA, USA) com tampa rosqueada provida de revestimento interno de silicone ligando a tampa ao frasco. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após esterilização adicionaram-se 30 g areia nos frascos. Em seguida, um microtubo de 1,5 mL sem tampa foi enterrado na areia até a sua metade. Sobre a superfície da areia foi colocado o soro de leite nos seguintes volumes 0,2, 0,5, 1,0; 1,5; 2,0 ou 2,5 mL. Os frascos foram fechados pela tampa rosqueada, foram mantidos por 24 horas em incubadora a 25°C, no escuro. Após este período, 1 mL de suspensão contendo 200 J2 de *M.*

incognita foi injetado, com auxílio de uma seringa, dentro do microtubo. Os frascos foram então mantidos novamente nas condições anteriores, por 24 horas. Ao final do período de exposição dos J2 aos COVs emitidos pelo soro de leite, abriram-se os frascos e uma suspensão de 200 µL foi transferida para uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Com o uso de um microscópio de objetiva invertida (NIKON TMS – FNo. 211213) os J2 móveis e imóveis foram quantificados. A placa de polipropileno foi então deixada aberta na bancada do laboratório por 24 horas, a temperatura ambiente. Após este período, observou-se a mobilidade dos J2. Aqueles nematoides que permaneceram imóveis foram considerados mortos.

3.3 Caracterização de COVs produzidos pelo soro de leite

Em frascos de microextração em fase sólida (SPME) de 20 mL foram adicionados 2 mL de soro de leite sobre 10g de areia, em seguida fechado hermeticamente. Como testemunha utilizou-se apenas areia. A seguir, os frascos foram colocados em incubadora a 28°C durante 24 horas após a selagem hermética dos frascos. Os compostos voláteis produzidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A análise de COVs foi realizada na Central de análise e prospecção química (CAPQ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil. Para extrair os COVs, utilizou-se a técnica de SPME (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990) no modo *headspace*, usando a fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano), com temperatura de extração (55°C), agitação (250 rpm) e tempo de extração (35 minutos) determinados. Para a separação e identificação dos COVs foi usado um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% fenil 95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250 °C, da interface de 240 °C e da fonte de íons do detector de 200 °C. O injetor foi operado no modo *splitless* ou no modo *split* 1:2, de acordo com a intensidade dos picos nas amostras. Como gás de arraste foi usado He grau 5.0 a 1,0 mL min⁻¹. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40 °C até 130 °C a 3 °C min⁻¹ e então até 240 °C a 10 °C min⁻¹. Para identificação dos COVs nas amostras, os espectros de massas de cada pico do cromatograma foram extraídos através do programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63. A identificação dos

COVs foi realizada por comparação dos espectros de massas dos picos das amostras com espectros da biblioteca NIST pelo programa Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington - DC, USA) e por comparação dos índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (ADAMS, 2007; NIST, 2017) Os índices de retenção experimentais foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos. Para a comparação entre os espectros de massas foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros for maior que 80%.

3.4 Concentração letal média (CL50) a J2 de *M. incognita* dos principais compostos orgânicos voláteis presentes no soro de leite

Foram determinadas as CL50 em J2 de *M. incognita* das seguintes moléculas encontradas nas emissões do soro de leite e adquiridas na Sigma-Aldrich®: ácido isovalérico ((CH₃)₂CHCH₂COOH anidro, 99,0%; Sigma-Aldrich), ácido acético (C₂H₄O₂ ACC Reagent; anidro, ≥ 99,7% ; Sigma-Aldrich), octanoato de etila (C₁₀H₂₀O₂; anidro, ≥ 98,0%, FCC, FG; Sigma-Aldrich) e ácido octanoico (C₈H₁₆O₂ anidro, ≥ 98,0%; FGSigma-Aldrich). Para condução deste ensaio foram utilizados microtubos com volume de 200 µL. Em cada um colocou-se 20 µL de uma suspensão contendo 20 J2 e 100 µL da solução da molécula diluída em Tween 80® (0,01%), nas concentrações finais de 0, 50, 150, 250, 350 ou 450 µg/mL. Os microtubos foram mantidos em incubadora a 28 °C por 24 horas. Ao final desse período, o conteúdo deles foi transferido para uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Com o uso de um microscópio de objetiva invertida (NIKON TMS – FNo. 211213) avaliaram-se a mobilidade e mortalidade dos J2. A mortalidade foi avaliada adicionando-se duas gotas de solução recém preparada de NaOH 1,0 mol/L em cada cavidade da placa. Os J2 que se moveram até 2 minutos após a adição do NaOH foram considerados vivos, enquanto os demais considerados mortos.

3.5 Toxicidade de moléculas das emissões do soro de leite a ovos de *M. incognita*

Para a realização deste ensaio, utilizou-se a metodologia descrita por Chen e Dickson (2000) e adaptada por Amaral et al. (2003). Em microtubos de 0,5 mL foram colocados 20 µL de uma suspensão contendo 1000 ovos de *M. incognita* e 100 µL de soluções individuais de ácido etanoico, octanoato de etila, ácido isovalérico ou ácido octanoico diluída em Tween 80®

(0,01%) nas seguintes concentrações finais: 0, 200, 400, 600, 800 ou 1000 µg/mL. Os micro tubos foram mantidos em incubadora a 25 ° C por 10 dias. Ao final o conteúdo dos micro tubos foi transferido para uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Usando microscópio de objetiva invertida os J2 eclodidos foram estimados.

3.6 Efeito da fumigação de substrato com ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanoico ou octanoato de etila na infectividade e reprodução *M. incognita*

Uma suspensão aquosa de 5 mL contendo 15.000 ovos de *M. incognita* foi distribuída em 1 L de substrato. Em seguida o substrato infestado com ovos foi colocado em garrafas plásticas 2 L (JARDIM et al., 2017). Os compostos, ácido acetico, ácido isovalérico, ácido octanoico e octanoato de etila foram então distribuídos no substrato a 1 mL por litro de substrato. O nematicida fumigante Basamid® (3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione) (substrato 250 mg/L) foi utilizado como controle positivo, enquanto 1 mL de água foi utilizado como controle negativo. Todas as garrafas foram fechadas com suas tampas e as misturas resultantes foram homogeneizadas por agitação das garrafas e mantidas a 28 °C, por três dias. As garrafas foram então abertas e permaneceram assim por cinco dias. A seguir, a mistura de cada frasco foi transferida para cinco copos plásticos de 200 mL de volume. Trinta dias após a semeadura, mudas de tomate foram transplantadas para os copos plásticos que continham a mistura e mantidas em estufa por 35 dias. Após esse período, as raízes foram cuidadosamente lavadas e pesadas. Contou-se o número de galhas em cada sistema radicular e assim a infectividade foi determinada (galhas por grama de raiz). A reprodução foi determinada de acordo com o número de ovos por grama de sistema radicular.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram repetidos duas vezes, utilizando delineamento inteiramente casualizados, com cinco repetições. Os dados de todos experimentos foram apresentados de forma conjunta. Os resultados foram, previamente, submetidos a testes de normalidade (ShapiroWilk) e homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). Atendidos os pressupostos, aplicou-se o teste F por meio da análise de variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$), as médias de cada tratamento foram comparadas usando o teste de Scott Knott, no ensaio de toxicidade de moléculas das emissões do soro de leite a J2. No experimento de toxicidade de moléculas das emissões do soro de leite a J2 de *M. incognita*, os

dados de galhas/grama de raiz e ovos/g de raiz foram transformados para $\log(x + 1)$. Para identificar a concentração letal (CL 50) capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população, as porcentagens de mortalidade dos J2 foram submetidas a uma análise de regressão não linear utilizando a equação quadrática. Os valores para CL 50 foram relatados com os respectivos erros padrão da média (EP).

5. RESULTADOS

5.1 Exposição de *M. incognita* aos COVS do soro de leite

Os COVs emitidos pelo soro de leite causaram alta imobilidade nos J2 de *M. incognita* comparado ao controle negativo ($p > 0,05$). Das quantidades testadas apenas 0,2 mL de soro de leite não imobilizou os J2, sendo estatisticamente similar ($p > 0,05$) ao controle negativo. Entretanto, a partir de 0,5 mL a imobilidade dos J2 ficou acima de 79% (Fig. 1). Os COVs emitidos pelo soro de leite causaram baixa mortalidade, chegando a 21,46% quando foi aplicada a maior dose.

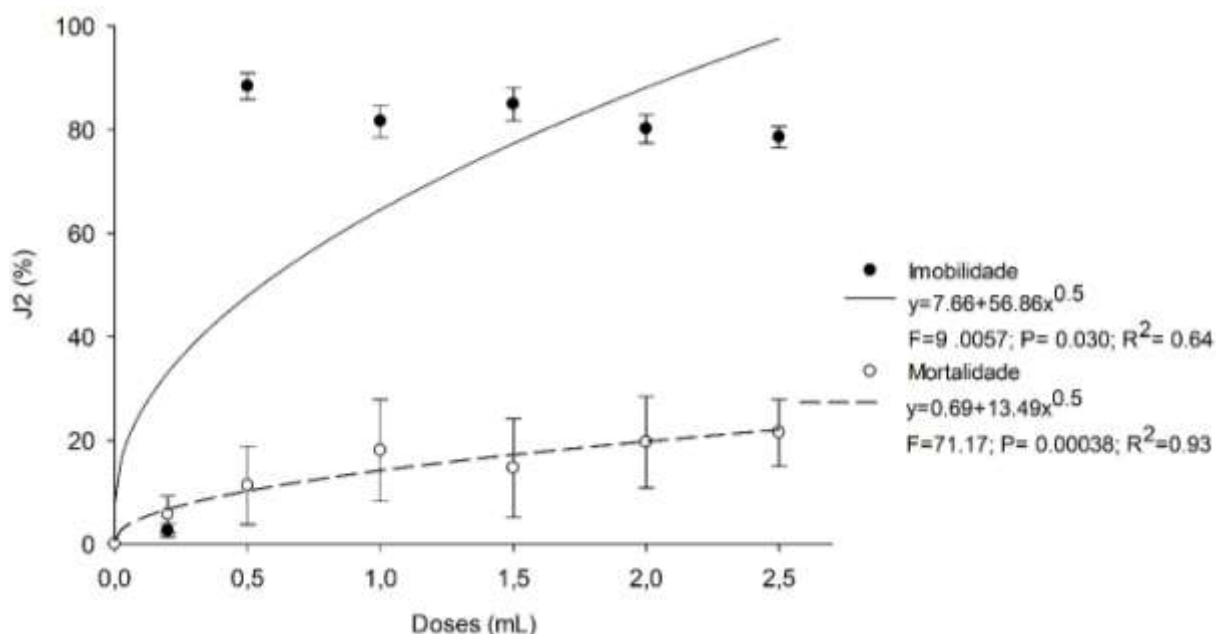


Figura 1. Imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* expostos por 24 h aos compostos orgânicos voláteis liberados por soro de leite. As barras representam o erro padrão médios. Os resultados de dois experimentos combinados são mostrados ($P > 0,05$).

5.2 Caracterização de COVs produzidos pelo soro de leite

Nas emissões voláteis do soro de leite foram identificadas 27 moléculas pertencentes as seguintes classes químicas: álcool, éster e ácido carboxílico (Tabela 1). Entre elas, cinco apresentaram maiores intensidades no cromatograma: ácido acético, 2-etil-hexanol, acetato de 2-etilhexano, ácido octanoico e octanoato de etila.

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis identificados no soro de leite por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME-CG-MS).

Compostos	Grupos	IR Exp. ^a	IR Lit. ^b
Etanol	Álcool	x	x
3-Metyl-1-butanol	Álcool	735	734
2-Metyl-1-butanol	Álcool	738	738
2,3 butanodiol	Álcool	796	806
Heptanol	Álcool	969	970
2-etil-hexanol*	Álcool	1031	1029
Octanol	Álcool	1073	1072
Feniletil álcool	Álcool	1115	1110
Ácido acético*	ácido carboxílico	633	603
Ácido isovalérico	ácido carboxílico	848	877
Ácido isobutírico	ácido carboxílico	777	765
Ácido hexanóico	ácido carboxílico	1009	1019
Ácido heptanóico	ácido carboxílico	1085	1078
Ácido octanóico*	ácido carboxílico	1197	1180
Ácido nonanóico	ácido carboxílico	1278	1275
Ácido decanóico	ácido carboxílico	1366	1373
Acetato de etila	Éster	622	628
Acetato de isobutila	Éster	772	776
Heptanoato de etila	Éster	1098	1095
Isovalerato de etila	Éster	858	856
Acetato de isopentila	Éster	876	876
Hexanoato de etila	Éster	998	1002
Heptanoato de etila	Éster	1098	1095

Acetato de 2-etilhexila*	Éster	1149	1159
Octanoato de etila*	Éster	1201	1196
Acetato de feniletila	Éster	1255	1252
Nonanoato de etila	Éster	1294	1282
Decanoato de etila	Éster	1380	1398

a

Índices de retenção calculados por injeção de uma série homóloga de alcanos

^b Índices de retenção de acordo com a literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2013)

* **Substâncias com maior intensidade.**

5.3 Toxicidade de moléculas encontradas no soro de leite a J2 de *M. incognita*

Neste ensaio foi determinada a atividade nematicida sobre J2 de *M. incognita* de quatro moléculas identificadas nas emissões do soro de leite, sendo elas: ácido acético, ácido octanóico, octanoato de etila e o ácido isovalérico. As quatro moléculas testadas causaram alta mortalidade a J₂ de *M. incognita* com valores de CL₅₀ que variaram de 134,30 a 236,08 µg mL⁻¹ sendo inferiores ao valor da CL₅₀ do carbofurano 260 µg mL⁻¹. Quando os J2 foram expostos ao controle negativo não observou-se mortalidade (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração letal média (CL₅₀) de compostos orgânicos voláteis, encontrados em emissões do soro de leite a juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Substância	CL 50/24h (µg mL ⁻¹)
(1) Ácido acético	192,95
(2) Ácido isovalérico	236,08
(3) Ácido octanóico	134,30
(4) Octanoato de etila	226,10
(5) Carbofurano*	260 (Oliveira et al., 2014)

* 3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione

5.4 Toxicidade de moléculas encontradas no soro de leite a ovos de *M. incognita*

Os compostos octanoato de etila, ácido acético, ácido octanoico e ácido isovalérico causaram reduções significativas ($P < 0,01$) na eclosão de J2 de *M. incognita* quando comparadas ao controle negativo, independentemente da concentração testada. O aumento da concentração correlacionou-se positivamente com as maiores reduções na eclosão de J2. As

maiores reduções na eclosão foram causadas pelo octanoato de etila e ácido acético na concentração de 1000 µg/mL, 88,7% e 84,7%, respectivamente (Figura 2).

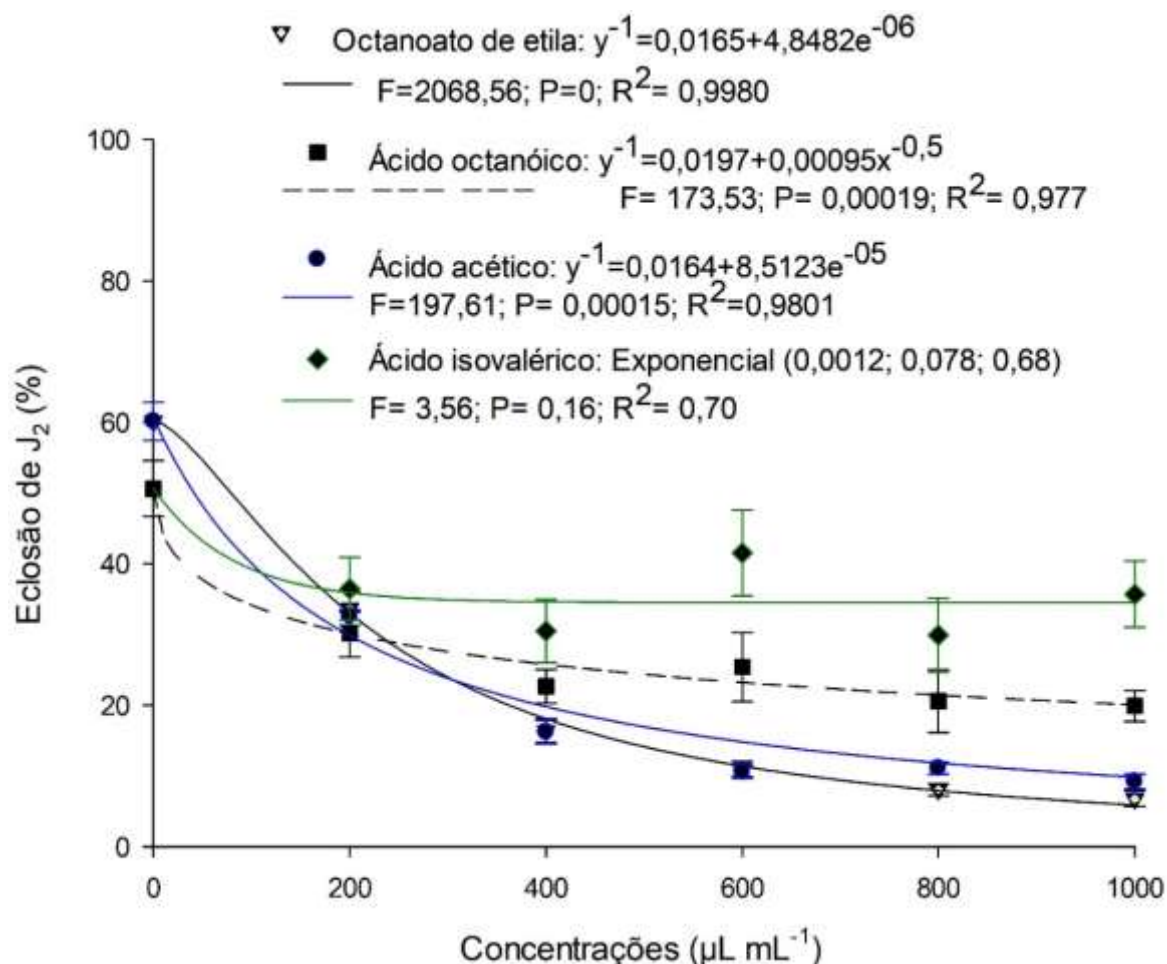


Figura 2: Porcentagem de eclosão de juvenis de segundo estágio (J_2) de *M. incognita* após exposição por 10 dias, aos compostos octanoato de etila, ácido octanóico e ácido acético, em diferentes concentrações. As barras representam o erro padrão médios. Os resultados de dois experimentos combinados são mostrados.

5.5 Efeito da fumigação com ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila na infectividade e reprodução *M. incognita*

A infectividade e a reprodução de *M. incognita* pela aplicação de ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila foram significativamente ($P<0,05$) reduzidas comparadas com o controle negativo. O octanoato de etila reduziu o número de ovos a valores similares ($P<0,05$) ao fumigante de solo Basamid. Os efeitos da aplicação de ácido acético e octanoato de etila na redução de galhas e ovos de *M. incognita* foram semelhantes ($P<0,05$).

O ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila reduziram a reprodução em 92,7, 57,10, 88 e 93,04 em relação a testemunha negativa. A redução na infectividade na mesma ordem foi de 93,24, 48,85 e 82,75 e 95,68%. O controle positivo reduziu a infectividade em 99,34% diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos (Figura 4).

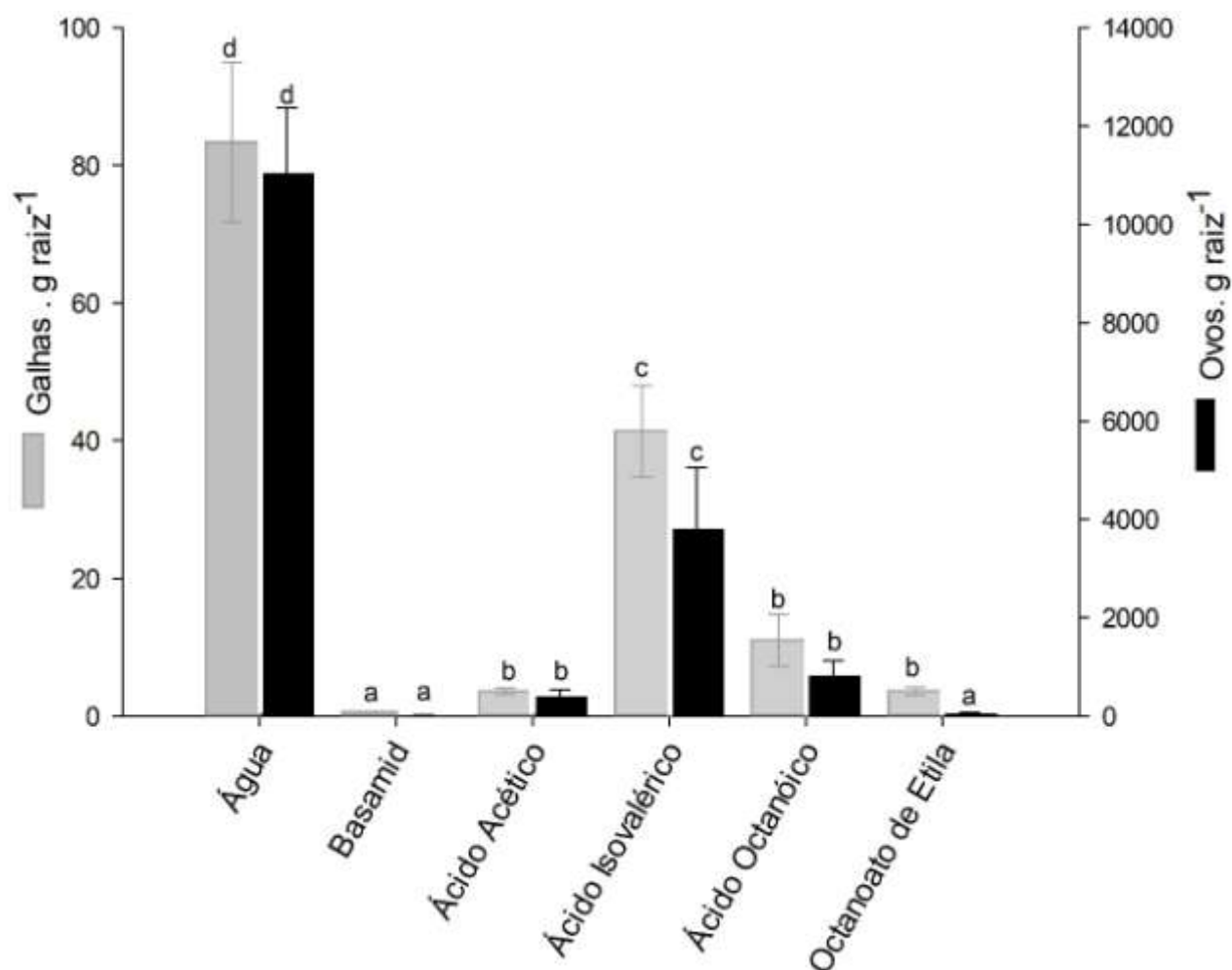


Figura 4: Infectividade e reprodução de *Meloidogyne incognita* após fumigação do substrato infestado com ovos de *M. incognita* por três dias. Foi utilizado para a fumigação os compostos ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila na concentração de 1 mL por litro de substrato. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de significância. Barras representam o erro padrão da média. Os resultados de dois experimentos combinados são mostrados.

6. DISCUSSÃO

A capacidade nematicida do soro de leite já foi demonstrada aplicando-o em substrato infestado com *M. incognita*, onde proporcionou redução de 76,9% na reprodução (DIAS-ARIEIRA et al, 2015). Salgado et al., (2003) também observaram redução na eclosão e 100% de mortalidade de J2 de *M. exigua* em contato direto com o soro de leite. Os autores atribuíram esses resultados à presença de microrganismos no soro de leite que modificam a concentração de dióxido de carbono, reduzindo oxigênio necessário para atividade metabólica do nematoide. No entanto o presente trabalho comprovou que além dos princípios já citados o soro de leite exerce efeito nematostático pela liberação de COVs (Figura 1). Barros et al., (2014) constataram o mesmo modo de ação com folhas frescas de nim (*Azadirachta indica*) e mostarda (*Brassica juncea*) liberando COVs tóxicos a J2 de *M. incognita*, o evento foi explicado devido a alterações provocadas por esses voláteis no sistema nervoso do fitonematoide.

Já é comprovado que para muitos resíduos o aumento da eficiência dos COVs liberados está diretamente correlacionada com o tempo de exposição, como já foi descrito em trabalhos com torta de algodão e também com sementes frescas e secas de girassol (*Helianthus annuus*) além de macerados de broto de brócolis (*Brassica oleracea*) onde a imobilidade e mortalidade foi aumentada a medida que o tempo foi aumentado (ESTUPIÑAN-LÓPEZ et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Nesse trabalho foram identificadas pela primeira por cromatografia gasosa por espectrometria de massa os COVs emitidos pelo soro de leite, nessas emissões foram observadas uma grande diversidade de moléculas. As moléculas do grupo dos ésteres são abundantes nas emissões do soro de leite (Tabela 1). Barros et al., (2014) também encontraram os ésteres como grupo de composto voláteis abundante nas emissões de macerado de nim e observaram atividade nematicida contra *M. incognita* para a maioria deles. Isso evidencia que esses grupos de compostos emitidos por vegetais e resíduos da agroindústria possuem potencial no controle de fitonematoides. No grupo dos álcoois as moléculas 2,3 butanodiol, 2-etil-hexanol e octanol já haviam sido encontradas em semente de girassol e nas emissões das bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. subtilis* e demonstraram atividades nematicidas contra *M. incognita* (DE PINHO et al., 2011; SILVA et al., 2018).

As moléculas voláteis do grupo ácido carboxílico encontrados no soro de leite: ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido hexanoico foram encontrados também em emissões de esterco líquido de porco este apresentou toxicidade a *Pratylenchus penetrans* e *Caenorhabditis elegans* (MAHRAN et al., 2008), no entanto não existem estudos utilizando essas moléculas de forma isolada no controle de *M. incognita*. No presente trabalho, o ácido acético foi selecionado e testado contra *M. incognita* por apresentar alta intensidade no cromatograma e por possuir potencial no controle de *Verticillium dahliae*, assim como o ácido isovalérico que também foi selecionada por esse motivo (LAZAROVITS et al., 2005). Além disso as moléculas adquiridas no mercado e presentes nas emissões voláteis do soro de leite aqui testado (ácido acético, ácido octanoico, ácido isovalérico e octanoato de etila) nenhuma foi anteriormente relatada com atividade nematicida contra *M. incognita*.

As baixas CL50 encontradas para as quatro moléculas testadas (Tabela 2) são inferiores à do nematicida carbofurano (OLIVEIRA et al., 2014), podendo ser candidatas para indústria após pesquisas complementares, uma vez constatado sua baixa toxicidade ao homem e ao meio ambiente (HELLER, et al., 2010; SASANELLI et al., 2014). A presença em alimentos e ou bebidas, ou no processos de produção de bebidas alcoólicas observada em todas as moléculas testadas explicita que estas são consumidas pelo ser humano, sendo um indício que essas moléculas possuem baixa ou nenhuma toxidade ao homem e ao meio ambiente. O ácido acético, é uma substância contida no vinagre, com concentração de pelo menos 40 g por litro de solução (MAPA, 2012), muito utilizada também na indústria alimentícia como conservante, além disso é utilizado na higienização de alimentos (ANAV, 2020). O ácido isovalérico, ácido octanoico e octanoato de etila são substâncias secundárias produzidas no processo de fabricação de vinhos e cachaça, essas são responsáveis pelo aroma frutado e adocicado da bebida (JANZATTI, 2004; SARTOR, 2014).

O efeito das moléculas ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanoico e octanoato de etila encontrados na emissão de voláteis do soro de leite na redução da eclosão de J2 de *M. incognita* (Figura 2) bem como a fumigação de substrato infestado com ovos de *M. incognita* (Figura 4) demonstra a capacidade delas de alcançar a camada interna lipídica (FERRAZ & BROWN, 2016) que é sempre protetora do ovo, inóculo abundante no solo em áreas infestadas por fitonematoídes. Como o ácido acético e o octanoato de etila foram mais eficazes na redução a eclosão e o octanoato de etila mais eficaz do que o ácido acético na fumigação do substrato infestado com ovos, a eficiência dessas moléculas podem ter relação não só com o poder em vencer a barreira lipídica, mas também em vencer a barreira quitinosa

que é a mais externa do ovo, no entanto isso são hipóteses que ainda precisam ser investigadas em estudos futuros.

O preço baixo do ácido acético e a boa eficácia do octanoato de etila tanto na eclosão de J2 como na fumigação dão suporte a novas pesquisas para viabilizar o seus usos na agricultura. Ao que tudo indica, a prospecção de moléculas voláteis a partir de emissões voláteis de resíduos da agroindústria criam possibilidades de fontes de insumos para o comércio de pesticidas.

7. CONCLUSÕES

- O soro de leite emite COVs que causam toxicidade a *M. incognita*.
- As moléculas ácido acético, ácido isovalérico, ácido octanóico e octanoato de etila reduziram significativamente a eclosão de J2, com maior eficácia para o octanoato de etila e ácido acético.
- Essas moléculas também reduziram significativamente a infectividade e reprodução de *M. incognita*, quando comparada ao controle negativo
- Fumigação do substrato infestado com ovos de *M. incognita*. Nesse ensaio o octanoato de etila reduziu a reprodução de *M. incognita* ao mesmo nível do controle positivo (Basamid).
- As moléculas octanoato de etila e ácido acético apresentaram perspectivas boas como candidatas a nematicidas para o agronegócio após novas pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; Castagnone-Sereno, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular plant pathology**, v.4 ed.4, p.217-224, 2003.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, USA, 2007.
- AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, F. E. R., AND OLIVEIRA D. F. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, v.5 ed.6, p.859-864, 2003.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. BERGAMIN. **Manual de Fitopatologia Principios e Conceitos - Vol 2**. 5^a ed. Ouro Fino, Minas Gerais: [s.n.], 2018.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry** v.62, ed.19, p.2145–2148, 1990. DOI: 10.1021/ac00218a019
- ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M.; SILVA, R. A.; GALBIERI, R. Manejo de nematoides. In: Freire, E.C. (ed.). Algodão no cerrado do Brasil. Abrapa, Brasília, Brasil: Grafica e Editora Positiva, 2015. p.445-483.
- Associação Nacional das Indústrias de Vinagre (ANAV), Clipping: Conheça mais sobre o vinagre. Disponível em: http://www.anav.com.br/clipping_interna.php?id=27 Acesso em: 06 de junho de 2020.
- Baker, K. F.; Cook, R. J. Biological control of plant pathogens. **WH Freeman and Company** 1974.
- BARKER, K. R.; KOENNIN.; STEPHEN R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 165-205, 1998.
- BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P., DA SILVA, J. C. P., LOPEZ, L. E., DA SILVA, A. P., POZZA, E. A., & PEDROSO, L. A. 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, n. 2, p. 190-199, 2014.
- BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P., DA 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 incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34-43, 2014.
- BASTOS, C. S.; TORRES, J. B. Controle biológico e o manejo de pragas do algodoeiro. **Embrapa Algodão-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

- BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia: conceitos e benefícios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**, v. 1, p. 540-553, 1995.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; KRAUSS, U.; STEFANOVA, M.; & COTES PRADO, A. M. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.
- BETTIOL, W. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. **Crop Protection**, v. 18, n. 8, p. 489-492, 1999.
- CAMPOS, V. P.; DE PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 525-535, 2010.
- CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity**, v. 96, n. 4, p. 282, 2006.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de 1079 enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, v.1080, ed. 25, p. 35-34. 2001.
- CHEN, S. Y., & D. W. DICKSON. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, ed.1, p.117–121, 2000.
- DA SILVA, J. C. P., CAMPOS, V. P., BARROS, A. F., PEDROSO, L. A., DE FREITAS SILVA, M., DE SOUZA, J. T. & DE 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.
- DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and Classification in Plant nematology. **Perry, RN, and Moens, M. (Eds.)**, 2006.
- DECRAEMER, WILFRIDA et al., Structure and classification. **Plant nematology**, n. Ed. 2, p. 3-39, 2013.
- DE PINHO, R. S. C. **Efeito de metabólitos bacterianos em diferentes estádios de *Meloidogyne incognita***. 74 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- DIAS-ARIEIRA, Claudia R; MATTEI, Danielle; PUERARI, Heriksen H e RIBEIRO, Regina CF. Uso de emendas orgânicas na gestão de nematoide de nó raiz em alface. *Hortic. O Sutiã*. [online]. 2015, vol.33, n.4 [citado 2020-07-06], pp.488-492. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362015000400488&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1806-9991. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000400013>.
- DONG, L. Q; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1-2, p. 31-45, 2006.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A., & ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical reviews in plant sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.

ESTUPIÑAN-LÓPEZ, L.; CAMPOS, V. P.; SILVA, A. P.; BARROS, A. F.; PEDROSO, M. P.; SILVA, J. C., & TERRA, W. C. Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 6, p. 443-450, 2017.

FERRAZ, L. C. C. B. Gênero *Pratylenchus* os nematóides das lesões radiculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, n. 1, 1999.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **Norma Editora, Manaus-AM**, p. 251, 2016.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; FURLANETTO, C.; & SCHWAN-ESTRADA, K. R. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.

FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; OLIVEIRA, D. F.; FARIA, M. R.; POHLIT, A. M & SILVA, J. R. C. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of nematology**, v. 44, n. 4, p. 321, 2012.

GAMBA, R. R.; DE A. GRACIELA.; PELÁEZ, A. L. Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 2, p. 249-255, 2016.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, v. 83, n. 9, p. 899-905, 1993.

GONZALEZ, A. [Comparison of five organic amendments for the control of *Globodera pallida* in microplots in Peru]. [Spanish]. **Nematropica**, 1993.

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**, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, 2007.

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

http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

HUANG, Y.; XU, C.; MA, L.; ZHANG, K.; DUAN, C.; MO, M. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3. 25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 3, p. 417-422, 2010.

HUSSEY, R. S.; BARKER. Uma comparação dos métodos de coleta de inóculos de *Meloidogyne* spp., incluindo uma nova técnica. *Planta dis Rep* 57: 1025– 1028, 1973.

JANZANTTI, NATALIA SOARES. "Compostos de volateis e qualidade de sabor da cachaça." (2004).

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.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G.; PERRY, R. N. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KARSEN, G. **The plant parasitic nematode genus Meloidogyne Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe**. Brill, 2002.

KHAN, Z., GAWADE, B.H., KANDAN, A. Resistant Cultivars: An option for Environment-friendly Management of Plant Parasitic Nematodes, ICAR-National Bur. Plant Genet. Resour. New Dellh. 2015

KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemical diversity of floral scent. In: **Biology of floral scent**. CRC press, 2006. p. 41-68.

LAZAROVITS, G.; CONN, K. L.; ABBASI, P. A.; Tenuta, Munderstanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. **Acta Horticulturae**, v. 698, p. 215, 2005.

LEFF, J. W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 1629-1636, 2008.

LEONETTI, P.; ZONNO, M. C.; MOLINARI, S.; ALTOMARE, C. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant cell reports**, v. 36, n. 4, p. 621-631, 2017.

LIMA, A. O. Biofumigação do solo com Brassica rapa para o controle de fitonematóides. **Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais**, 2006.

LORD, J. S.; LAZZERI, L.; ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E. 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 and food chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7882-7890, 2011.

LUCON, C. M.; CHAVES A. L.; BACILIERI, S. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. Cleusa Maria Mantovanello Lucon, 1º e., Instituto Biológico, São Paulo, p. 28, 2014

MACHADO, A. C. Z.; K, L.; P, Z. V. Controle biológico. **Boletim de P&D**, v. 78049, p. 287, 2011

MAHRAN, A.; TENUTA, M.; HANSON, M. L.; Daayf, F. Mortality of *Pratylenchus penetrans* by volatile fatty acids from liquid hog manure. **Journal of nematology**, v. 40, n. 2, p. 119, 2008.

MCSORLEY, R.; THOMAS, S. H. Diseases caused by nematodes. In: PERNEZNY, K. L.; ROBERTS, P. D.; MURPHY, J. F.; GOLDBERG, N. P. Compendium of pepper disease. Saint Paul: The American Phytopathological Society, p. 46-49, 2003

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa número 6, de 03 de abril de 2012. Instrução Normativa MAPA, n.6, 2012. Disponível em: <http://www.anav.com.br/legislacao.php?id=29> . Acesso em: 06 de junho de 2020.

NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; COUTINHO, M. M.; PARREIRA, D. F.; FERRAZ, S.; COSTA, M. D. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 195-201, 2007.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; DEN NIJS, L.; HOCKLAND, S.; MAAFI, Z. T. Current nematode threats to world agriculture. In: **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Springer, Dordrecht, p. 21-43, 2011

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments a review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101-115, 2010.

OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; YANIV, Z.; SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 710-715, 2000.

PEDROSO, L. A.; CAMPOS, V. P.; PEDROSO, M. P.; BARROS, A. F.; FREIRE, E. S.; RESENDE, F. M. Volatile organic compounds produced by castor bean cake incorporated into the soil exhibit toxic activity against *Meloidogyne incognita*. **Pest management science**, v. 75, n. 2, p. 476-483, 2019.

PINHEIRO, J.B. 2017. Nematoides em hortaliças, Brasília, DF, Embrapa, 194p.

RAO, M.S.; UMAMAHESWARI, R.; PRITI, K.; RAJINIKANTH, R.; GRACE, G.N.; KAMALNATH, M.; et al. 2016. Role of Biopesticides in the Management of Nematodes and Associated Diseases in Horticultural Crops, In: Plant, Soil Microbes, Springer International Publishing, Cham, p. 117–148.

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, n. 3, p. 380-385, 2008.

RODRIGUES, A. K.; FREITAS, L. G.; AZEVEDO, A. A.; FERRAZ, S. Development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. parasitizing different host plants. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 267-272, 2003.

SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, V. P. Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 02, p. 166-170, 2003.

SARTOR, SABRINA DE BONA. "Compostos voláteis em vinhos Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) produzidos em diferentes regiões brasileiras." (2014).

SASANELLI, N.; DONGIOVANNI, C.; LEOCATA, S.; ARBIZZANI, A.; SANTORI, A.; MYRTA, A.; GRECO, N. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by Dimethyl Disulfide (DMS) applied in drip irrigation on melon and tomato in apulia and basilicata (Italy). *Acta Horticulturae*, Bruxelas, v. 1044, p. 401-404, 2014.
DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1044.54

SASSER, J. N. A. world perspective on nematology: the role of the society. **Vistas on Nematology**, p. 7-14, 1987.

SBN – Sociedade Brasileira de Nematologia. Disponível em: <http://nematologia.com.br/>
Acessado em: 19 de outubro de 2019.

SILVA, J. C. P.; CAMPOS, V. P.; BARROS, A. F.; PEDROSO, M. P.; TERRA, W. C.; LOPEZ, L. E.; DE SOUZA, J. T. Plant volatiles reduce the viability of the root-knot

nematode *Meloidogyne incognita* either directly or when retained in water. *Plant Disease*, v.102, ed.11, p. 2170-2179, 2018.

SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, R. G.; SILVA, J. Reação de adubos verdes de verão e de inverno às raças 1, 2 e 4 de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v. 16, 1992.

SINGH, S. K.; HODDA, M.; ASH, G. J. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. **Eppo Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 334-374, 2013.

STAPLETON, J. J.; DUNCAN, R. A. Soil disinfestation with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii* and *Pythium ultimum*. **Plant Pathology**, v. 47, n. 6, p. 737-742, 1998.

SUASSUNA, N. D.; SCOZ, L. B.; GIBAND, M. Melhoramento genético do algodoeiro para resistência aos nematóides: seleção assistida por marcadores moleculares. **Boletim de P&D**, v. 78049, p. 243, 2016.

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.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 53-77, 2001.

VIGLIERCHIO, D. R. **The world of nematodes**. DR Viglierchio, 1991.

WEISCHER, B.; BROWN, D. J.F. **Conhecendo os nematóides: nematologia geral**. Pensoft, 2001.

ZATARIM, M.; CARDOSO, A. I. I.; FURTADO, E. L. Effect of types of cow milk on the powdery mildew control of pumpkin under field conditions. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 198-201, 2005.