

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

GUILHERME DE RESENDE CAMARA

TOXICIDADE DE MANIPUEIRA SOBRE *Meloidogyne* spp.

**ALEGRE
ESPÍRITO SANTO
2015**

GUILHERME DERESENDE CAMARA

TOXICIDADE DE MANIPUEIRA SOBRE *Meloidogyne* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração de Fitossanidade/Fitopatologia.

**ALEGRE
ESPÍRITO SANTO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C172t Camara, Guilherme de Resende, 1988-
Toxicidade de manipueira sobre *Meloidogyne* spp. / Guilherme de Resende Camara. – 2015.
48 f. : il.

Orientador: Fábio Ramos Alves.
Coorientador: Willian Bucker Moraes.
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Meloidogyne javanica*. 2. *Meloidogyne enterolobii*.
3. *Meloidogyne exigua*. 4. Controle alternativo. I. Alves, Fábio Ramos.
II. Moraes, Willian Bucker. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 63

GUILHERME DE RESENDE CAMARA

TOXICIDADE DE MANIPUEIRA SOBRE *Meloidogyne* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração de Fitossanidade/Fitopatologia.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Fábio Ramos Alves
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Willian Bucker Moraes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Elcio do Nascimento Chagas
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Espírito Santo

Aos meus pais, Maristella Ronchetti de Resende e Augusto Roberto Camara Dias, pela dedicação e incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado à vida, por ter me guiado pelo caminho certo durante a graduação e ter me abençoado com a presença persistente de pessoas que me foram suporte.

Aos meus pais, pelo esforço para que eu alcançasse meus objetivos.

À Universidade Federal de Espírito Santo, especialmente aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela significativa contribuição em minha vida pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Fábio Ramos Alves, pela orientação, confiança e oportunidade proporcionada.

Ao Prof. Dr. Elcio do Nascimento Chagas, Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago e ao Prof. Dr. Willian Bucker Moraes, pela participação na banca, incentivo e sugestões para melhoria do trabalho.

Ao amigo Eufrânio Lucindo Júnior, pela atenção, auxílio, paciência e incentivo.

Aos profissionais, colegas e amigos de laboratório, João Paulo Pereira Paes, Ângelo Oliveira, Patrícia Elisa, Tatiane Paulino da Cruz, Rodolfo Mendonça e Márcia Varela da Silva, pela experiência compartilhada e acompanhamento durante a realização do trabalho.

Aos amigos Márcio Antônio de Araújo, Jaimel de Oliveira Lima, Onofre Augusto Miranda, João Paulo Pereira Paes, Maria das Graças Jorge, Anderson Luiz Kruger, Luiz Carlos Coelho, Kayque Meneguelli, Wendell dos Reis Veloso, Luiz Fernando Cattermol, Sirlene Lucindo e Amanda Tristão Meneguelli, pela amizade, apoio e incentivo dado, mesmos nas conversas mais descontraídas.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este momento!

“Um homem não é nada além daquilo que a educação faz dele.”

Immanuel kant

BIOGRAFIA

GUILHERME DE RESENDE CAMARA, filho de Maristella Ronchetti de Resende e Augusto Roberto Camara Dias, nasceu no Rio de Janeiro – RJ, em 17 de janeiro de 1988.

Em fevereiro de 2003, ingressou na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal / Universidade Federal de Viçosa (CEDAF/UFV), onde obteve o título de Técnico Agrícola, em fevereiro de 2006.

Em fevereiro de 2013, graduou-se em Agronomia pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre – ES.

Em Março de 2013, ingressou no Programa de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES, concentrando seus estudos na área de Fitossanidade/Fitopatologia, submetendo-se a defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2015.

RESUMO

A manipueira é um líquido extraído da mandioca (*Manihot esculenta* L.) durante o processo de fabricação da farinha e contém um glicosídeo tóxico denominado de linamarina, do qual se origina o ácido cianídrico (HCN), substância responsável por efeitos tóxicos sobre fitopatógenos. Como o descarte da manipueira na natureza pode acarretar em sérios problemas ambientais, objetivou-se neste trabalho: a) avaliar a eficiência da manipueira na mortalidade de *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua*, em ensaios *in vitro*; b) Determinar a CL₅₀ para *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua*, em ensaios *in vitro*. A avaliação do pH e do ácido cianídrico presente na manipueira foram monitorados por 168 horas, em amostras armazenadas à temperatura ambiente e em refrigerador, à 6 ± 3°C. Os experimentos foram conduzidos *in vitro*, em delineamento inteiramente casualizado. No primeiro experimento, juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* foram submetidos à concentrações 0, 25, 50, 75 e 100% de manipueira, com cinco repetições. Com base no resultado do primeiro estudo, realizou-se o segundo experimento, com nove tratamentos e cinco repetições, no qual J2 de *M. javanica* foram tratados com 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24% de manipueira. Os mesmos estudos foram feitos para *M. enterolobii* e *M. exigua*. Para ambos os experimentos, cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio de 5mL de capacidade, no qual foram depositados 02 mL de suspensão aquosa contendo 500 J2 de *Meloidogyne* spp. + 02 mL da solução de manipueira. Os teores de CN⁻ determinados variaram de 3 a 30 mg.L⁻¹, tanto para a manipueira armazenada a temperatura ambiente quanto para a armazenada em refrigerador 6 ± 3 °C. A manipueira armazenada em refrigerador 6 ± 3°C apresentou maiores teores de CN⁻ e maior estabilidade ao longo do tempo. À partir de 25% a manipueira foi efetiva na mortalidade de *Meloidogyne* spp., causando a morte de 100% dos J2 tratados. Para todas as espécies de nematoides em estudo a concentração mínima (3%) foi mais eficiente do que a testemunha em relação à mortalidade dos patógenos. A CL₅₀ para *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua* foi de 8,97%, 6,89 e 9,57%, respectivamente.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne exigua*, Controle alternativo.

ABSTRACT

The cassava is a liquid extracted from the cassava (*Manihot esculenta* L.) during the manufacturing process of the flour and contains a toxic glycoside called linamarin, which originates hydrocyanic acid (HCN), substances responsible for toxic effects on plant pathogens. As the disposal of cassava in nature can result in serious environmental problems, the aim of this work: a) evaluate the efficiency of cassava in mortality of *M. javanica*, *M. enterolobii* and *M. exigua*, in vitro assays; b) determine the CL₅₀ for *M. javanica*, *M. enterolobii* and *M. exigua*, in vitro assays. The evaluation of pH and hydrogen cyanide present in the cassava were monitored for 168 hours, samples stored at ambient temperature and in a refrigerator at $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$. The experiments were conducted in vitro, in a completely randomized design. In the first, second stage juveniles (J2) of *M. javanica* were subjected to concentrations of 0, 25, 50, 75 and 100% of cassava, with five replications. Based on the results of the first study, there was the second experiment, with nine treatments and five replications, where J2 of *M. javanica* were treated with 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24% of cassava. The same studies have been made to *M. enterolobii* and *M. exigua*. For both experiments, each replicate consisted of a 5 mL vial capacity, which were deposited in 02 ml of aqueous suspension containing 500 J2 Meloidogyne spp. + 02 ml of cassava solution. The contents determined CN ranged from 3 to 30 mg.L⁻¹ for both the cassava stored at room temperature as stored in a refrigerator for $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$. The cassava stored in a refrigerator $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$ showed higher CN⁻ concentration and improved stability over time. At from 25% to cassava was effective in mortality of Meloidogyne spp., causing the death of 100% of treated J2. For all species of nematodes studied the minimum concentration (3%) was more efficient than the witness in relation to mortality of pathogens. The CL₅₀ for *M. javanica*, *M. enterolobii*, and *M. exigua* was 8.97%, 6.89% and 9.57%, respectively.

Keywords: *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne exigua*, Alternative control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 HIPÓTESES.....	15
4 REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS FITONEMATOIDES.....	16
4.2 O GÊNERO <i>Meloidogyne</i>	16
4.3 MANEJO DOS FITONEMATOIDES.....	17
4.4 MANIPUEIRA.....	18
4.4.1 Composição química da manipueira	19
4.4.2 Utilização da manipueira no controle de fitopatógenos	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>M. enterolobii</i> E <i>M. exigua</i>	21
5.2 IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>Meloidogyne</i> spp. POR ELETROFORESE	22
5.3 OBTENÇÃO DA MANIPUEIRA.....	23
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CIANETO NA MANIPUEIRA	23
5.5 ESTUDO DA PERSISTÊNCIA DO CIANETO E AVALIAÇÃO DO pH EM MANIPUEIRA.....	23
5.6 CONDUÇÃO DOS ENSAIOS.....	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CIANETO NA MANIPUEIRA	26
6.2 PERSISTÊNCIA DO CIANETO E AVALIAÇÃO DO pH EM MANIPUEIRA	26

6.3 EFEITO DA MANIPUEIRA SOBRE A MORTALIDADE DE <i>Meloidogyne</i> spp. em teste <i>in vitro</i>	30
6.3.1 <i>M. javanica</i>	30
6.3.2 <i>M. enterolobii</i>	31
6.3.3 <i>M. exigua</i>	35
7 CONCLUSÃO	41
8 REFERÊNCIAS	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Variação do teor de cianeto presente na manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile e armazenada em temperatura ambiente e em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), durante 168 horas..... 27
- Figura 2. Variação do pH da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile e armazenada em temperatura ambiente e em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), durante 168 horas. 28
- Figura 3. Relação da variação do teor de cianeto com o pH da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile e armazenada em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), durante 168 horas de avaliação. 29
- Figura 4. Relação da variação do teor de cianeto com o pH da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile armazenada à temperatura ambiente, durante 168 horas de avaliação. 29
- Figura 5. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre *Meloidogyne javanica*. 30
- Figura 6. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne javanica*. 31
- Figura 7. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne enterolobii*. 33
- Figura 8. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne enterolobii*. 34
- Figura 9. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne exigua*. 35
- Figura 10. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne exigua*. 36

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp., apresentam-se, em diversos países, como um dos principais fatores limitantes ao cultivo de diversas culturas, devido á ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros, incluindo a maioria das plantas exploradas economicamente (CAMPOS, 1985; COSTA et al., 2013).

Estima-se que, em média, as reduções anuais de produção ocasionadas por fitonematoides no mundo giram em torno de 14%, as quais podem ser traduzidas em prejuízo de quase 100 bilhões de dólares (MITKOWSKI e ABAWI, 2011).

No Brasil, os nematoides de galhas são frequentemente encontrados em áreas agrícolas, sendo comuns as espécies *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exígua* (DIAS-ARIEIRA, 2010).

A manipueira é o resíduo líquido extraído da mandioca (*Manihot esculenta* L.), durante o processo de fabricação de farinha e (ou) amido (PONTE, 1992; BUENO, ALMEIDA e DEL BIANCHI, 2010; FURLANETTO, 2011; CASSONI e CEREDA, 2011). Visto que sua composição apresenta um glicosídeo tóxico denominado linamarina, do qual se origina o ácido cianídrico (HCN) (PONTE, 1999; BUENO, ALMEIDA e DEL BIANCHI, 2010; CASSONI e CEREDA, 2011), estudos indicam seu uso como manejo alternativo de pragas e patógenos importantes em culturas exploradas economicamente (GONZAGA, 2008; FURLANETTO, 2011).

A utilização de técnicas racionais de manejo é desejável para a redução de populações de *Meloidogyne* spp. a níveis inferiores aqueles capazes de causar prejuízos (PIMENTA e CARNEIRO, 2005). Este fato, associado à tendência da atual sociedade em obter alimentos orgânicos ou com o mínimo possível de agrotóxicos, faz com que produtos naturais, como a manipueira, tenham um futuro promissor, desde que seu custo seja competitivo com os químicos (ALVES et al., 2012).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a eficiência da manipueira na mortalidade de *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a toxicidade da manipueira, em diferentes concentrações, na mortalidade de *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua*, em ensaios *in vitro*.

Determinar a CL₅₀ para *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua*, em ensaios *in vitro*.

3 HIPÓTESES

- O uso da manipueira promove a mortalidade dos fitonematoides em estudo.
- O maior nível de manipueira é mais eficiente na mortalidade dos nematoides em estudo.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS FITONEMATOIDES

Os nematoides fitoparasitos causam consideráveis prejuízos a agricultura mundial, tanto pela redução na produtividade e qualidade dos produtos, quanto pela limitação agrícola dos solos e aumento dos custos de produção (BARCELOS, 1997).

A estimativa média de reduções anuais de produção ocasionadas por fitonematoides no mundo é de 14%, o que implica em prejuízo econômico de 100 bilhões de dólares (MITKOWSKI e ABAWI, 2011).

A intensidade dos danos e das perdas depende da densidade populacional dos fitonematoides, da suscetibilidade da cultura, das condições ambientais e da presença de outros patógenos que podem interagir com os fitonematoides (PINOCHET, 1987).

Nesse contexto, inserem-se os danos quantitativos e qualitativos. Os primeiros referem-se à redução da produtividade e, nesse caso, as plantas infectadas apresentam menor eficiência do sistema radicular para realização de suas funções de absorção e condução de água e nutrientes. Conseqüentemente, observa-se baixa eficiência na nutrição, o que implica em gastos adicionais com fertilizantes para manutenção da produtividade (LORDELLO, 1988). Já os danos qualitativos dificultam o comércio do produto agrícola, pois provocam principalmente diminuição e alteração no formato e no tamanho dos frutos (VIAENE e ABAWI, 1996; 1998; CHEN et al., 1999; CASTILLO et al., 2006; SANTOS et al., 2006).

4.2 O GÊNERO *Meloidogyne*

Nematoides compreendem um filo de organismos que incluem parasitas de plantas e de animais, assim como muitas espécies de vida livre (CAMPOS,

2000; FERRAZ e MONTEIRO, 2005). Os nematoides parasitas de plantas, também conhecidos como fitonematoides, são parasitas obrigatórios que nutrem-se a partir de células vegetais vivas (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996).

Os nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp., (GOELDI, 1892) apresentam-se, em diversos países, como um dos principais fatores limitantes ao cultivo de diversas culturas por estarem amplamente disseminados em áreas agrícolas e também pelo fato de parasitarem a maioria das culturas anuais e perenes, hortaliças e plantas ornamentais, inclusive plantas daninhas (CAMPOS, 1985; COSTA et al., 2013).

Parasitas obrigatórios de raízes, o gênero *Meloidogyne* inclui cerca de 90 espécies descritas e, entre estas, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua* são de grande importância (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991).

4.3 MANEJO DOS FITONEMATOIDES

Há várias medidas de controle indicadas para redução populacional de fitonematoides, mas nem sempre elas são exequíveis em todas as áreas de cultivo (Tihohod, 1993). O controle químico, feito através de nematicidas sintéticos, é amplamente difundido em todo o mundo, sendo a opção mais usada pelos agricultores (RITZINGER, FANCELLI e RITZINGER, 2010); entretanto, tem se mostrado cada vez mais desaconselhável, tanto pelo elevado preço destes produtos, quanto por serem altamente tóxicos aos homens e animais, tornando-se potenciais contaminantes de solo e águas subterrâneas (STOLF, 2006).

Por tais motivos, muitos nematicidas químicos já foram excluídos do mercado e, com isso, produtos microbianos e naturais, como a manipueira, assumem considerável importância, apresentando potencial na substituição de produtos químicos (ALVES et al., 2012).

4.4 MANIPUEIRA

A manipueira ou água-brava é o resíduo líquido extraído da mandioca (*Manihot esculenta* L.), durante o processo de fabricação de farinha e (ou) amido (PONTE, 1992; BUENO, ALMEIDA e DEL BIANCHI, 2010; FURLANETTO, 2011; CASSONI e CEREDA, 2011). Apresenta aspecto leitoso e cor amarelo-claro (PONTE, 1992; PONTE, 2001; BUENO, ALMEIDA e DEL BIANCHI, 2010), sendo produzidos em torno de 250 litros deste resíduo a cada tonelada de mandioca processada (ralada e prensada) pelas indústrias (FURLANETTO, 2011).

As características químicas e orgânicas da manipueira possibilitam a utilização na agricultura como adubo orgânico em fertirrigação e como herbicida no controle de plantas daninhas (FURLANETTO, 2011). Visto que sua composição apresenta um glicosídeo tóxico denominado linamarina, do qual se origina o ácido cianídrico (HCN) (PONTE, 1999; BUENO, ALMEIDA e DEL BIANCHI, 2010; CASSONI e CEREDA, 2011), estudos indicam seu uso como manejo alternativo de pragas e patógenos importantes em cultura exploradas economicamente (GONZAGA, 2008; FURLANETTO, 2011). Os impactos ambientais causados pela deposição inadequada de manipueira estão relacionados com a composição química e ao considerável volume de resíduo líquido gerado (CEREDA, 2001; FURLANETTO, 2011).

Outro fator de contaminação ambiental ocasionada pela deposição inadequada da manipueira, quando liberados em fontes de água, é a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e a Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) (CEREDA, 2001; CORDEIRO, 2006). Quando se compara a DBO de dejetos orgânicos gerados por agroindústrias de mandioca com a contribuição normal “per capita” de esgotos domésticos, uma fecularia que processe, individualmente, uma tonelada de raízes por dia, equivalerá à poluição ocasionada por 150 a 250 habitantes/dia (CEREDA, 2001).

O cuidado com a preservação ambiental tem crescido em paralelo com o aumento da produção de resíduos gerados pelo agronegócio, que pode ser

usado na agricultura como uma forma de substituir parcialmente os fertilizantes ou agrotóxicos comerciais sintéticos (SANTOS et al., 2010).

4.4.1 Composição química da manipueira

A composição química da manipueira é variável. O ácido cianídrico (HCN) e o cianeto livre (CN⁻) são os constituintes tóxicos presentes na manipueira, com concentrações variáveis, as quais dependem da idade das plantas, variedade cultivada, tipo de tecido vegetal e com fatores ambientais, tais como solo, umidade e temperatura (CEREDA, 2000; 2001; FIORETTO, 2001; CORDEIRO, 2005; 2006).

O HCN interfere nas atividades enzimáticas (FIORETTO e BRINHOLI, 1985), enquanto o cianeto é uma das substâncias mais letais já descobertas (MCMAHON et al., 1995), e atua nas células nervosas individualmente ou reagindo com a hemoglobina dos glóbulos vermelhos, formando a cianohemoglobina, a qual paralisa o sistema e a cadeia respiratória (NASU, 2008).

4.4.2 Utilização da manipueira no controle de fitopatógenos

A manipueira foi estudada quanto ao seu efeito fungicida contra o oídio (*Oidium* sp.) em frutos de cerigueleira e causou deformação de conídios e conidióforos do fungo (FREIRE, 2001).

Nasu et al. (2010), em testes *in vitro*, concluíram que tratamentos com manipueira controlaram *M. exigua* raça 3 na cultura do tomateiro, promovendo a morte de 100% dos J2.

Alves et al. (2006), utilizaram a manipueira nas concentrações de 100, 80, 60, 40 e 20% no controle do nematoide *Scutellonema bradys* (Stainer & Le Hew) Andrassy e constataram que, após 48 horas, os tratamentos com a manipueira em concentração superior a 40% promoveram 100% da mortalidade, sendo que o tratamento a 20% apresentou, também, resultados superiores ao nematicida testado; no entanto, os autores não revelaram a concentração de cianeto na manipueira testada.

De acordo com Grabowski (2007), fatores como dosagens a serem aplicadas e seus efeitos sobre diferentes patossistemas, bem como a estimativa da concentração mínima letal de cianeto a nematoides ainda não foram determinados.

A estabilidade de uma solução refere-se à passagem de uma condição quimicamente instável a quimicamente estável (BATALHA, 1998). Estudos que visem avaliar a persistência e estabilidade do cianeto, assim como a do pH, tornam-se importantes para a compreensão e determinação do uso da manipueira no controle de fitopatógenos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), situado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), localizada no município de Alegre - ES, latitude 20°45' Sul, longitude 41°48' Oeste e altitude de 250 m.

5.1 MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne javanica*, *M. enterolobii* E *M. exigua*

Populações puras de *M. javanica* foram multiplicadas e mantidas em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicon* Mill), cv. Santa Clara, em casa de vegetação, conforme descrito por Peixoto (1995); enquanto a população pura de *M. enterolobii* foi multiplicada e mantida em raízes de goiabeira (*Psidium guajava* L.), cv. Paluma. Já *M. exigua* foram multiplicados e mantidos em raízes de cafeeiro 'Catuaí Vermelho IAC 44'.

O substrato empregado para o plantio do tomateiro e da goiabeira foi composto de solo e areia 1:1. O solo, coletado de local não cultivado, foi peneirado e autoclavado por 2 horas a 140° C, sendo esse processo repetido três vezes.

Oitenta dias após a inoculação das plantas de tomate/goiaba/café com as espécies de *Meloidogyne* anteriormente mencionadas, extraiu-se das raízes os nematoides (ovos + juvenis de segundo estágio, J2) pelo método de Hussey e Barker (1973) modificado por Bonetti e Ferraz (1981).

A concentração de inóculo, obtida em suspensão aquosa, foi estimada com auxílio de uma câmara de contagem de Peters, em microscópio, segundo Southey (1970). Posteriormente, foram montadas câmaras de eclosão que foram mantidas a 27°C, por cinco dias, até que eclodisse o quantitativo suficiente de J2 para a montagem do experimento (CLIFF e HIRSCHMANN,

1985). As coletas dos J2 foram realizadas a cada 24 horas, sendo necessárias três coletas para obtenção da quantidade de J2 desejada.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne* spp. POR ELETROFORESE

Para confirmar as espécies de *Meloidogyne* utilizadas nos experimentos, realizou-se a análise isoenzimática da enzima esterase (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001), em que 70 fêmeas maduras com coloração branco-leitosa foram extraídas de raízes galhadas, sob microscópio estereoscópio.

Como padrão de referência para as análises, utilizou-se fêmeas de *Meloidogyne* spp, previamente identificadas, multiplicadas e mantidas em raízes de tomateiro/goiabeira/cafeeiro, cultivadas em casa de vegetação.

As fêmeas foram maceradas em tubos tipo ependorf, contendo 15µL de solução extratora. Posteriormente, foi realizada a corrida eletroforética, durante 01 hora e 10 minutos, a 10°C, em aparelho vertical modelo PowerPac™Basic, com gel de poliacrilamida. Após a corrida, o gel foi retirado das placas de vidro e transferido a uma bandeja plástica contendo solução tampão de eletrodo (1,5g de Tris-base, 7,1g de glicina e 1000 mL de água destilada). Posteriormente a lavagem do gel, a solução tampão foi descartada e adicionou-se solução contendo corantes Fast Blue RR e α -naftil acetato, no qual o gel foi incubado por aproximadamente 60 minutos a 37°C, para a formação das bandas. Com as bandas de esterase já coradas, a solução corante foi descartada, sendo adicionada solução descolorante (composta de 650 mL de água destilada, 300 mL de metanol e 50 mL de ácido acético) e, após 60 minutos, foi adicionado à solução de secagem (gel lavado com água destilada e colocado em solução secadora contendo 24 mL de glicerol, 400 mL de etanol e 600 mL de água destilada). O padrão de bandas foi fotodocumentado.

5.3 OBTENÇÃO DA MANIPUEIRA

A manipueira utilizada nos ensaios foi proveniente de uma indústria de farinha, localizada na cidade de Marataízes/ES, latitude 21.044576° Sul e longitude 40.965877° Oeste, elevação 22 metros, e foi utilizada 24 horas após a extração para evitar possíveis alterações significativas na composição. A variedade da mandioca utilizada por essa indústria é a “Mandioca Brava - Pão do Chile”.

Em laboratório, a manipueira foi filtrada em tecido de algodão e mantida em repouso por aproximadamente uma hora, com o intuito de decantar o amido e resíduos sólidos ainda presentes na solução. Coletou-se o sobrenadante que foi armazenado em frascos tipo Erlenmeyer 250 mL, devidamente etiquetado e armazenado em refrigerador, $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$, até a realização do experimento, sendo esta considerada a solução de manipueira padrão para as diluições.

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CIANETO NA MANIPUEIRA

Antes da realização de cada experimento, o teor de cianeto foi calculado utilizando-se ‘teste rápido – indicador de cianeto Quantofix 0-1-3-10-30mg/L CN’. Os valores obtidos foram de 30mg.L^{-1} em manipueira pura.

5.5 ESTUDO DA PERSISTÊNCIA DO CIANETO E AVALIAÇÃO DO pH EM MANIPUEIRA

O teor de cianeto presente na manipueira foi monitorado durante sete dias, conforme descrição no item 5.4, a fim de se avaliar a persistência do ácido na solução de manipueira pura quando armazenada em temperatura ambiente e

em refrigerador $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$. O mesmo estudo foi feito com relação ao pH da solução através de medições com 'pH-Fix 0-14 Macherey-Nagel'.

5.6 CONDUÇÃO DOS ENSAIOS

Quatro experimentos, *in vitro*, foram conduzidos no Laboratório de Nematologia do NUDEMAFI em um delineamento inteiramente casualizado. No primeiro experimento, com cinco tratamentos e cinco repetições, J2 de *M. javanica* foram submetidos à concentrações crescentes de manipueira, quais sejam: 0, 25, 50, 75 e 100%. Com base no resultado do primeiro estudo, realizou-se o segundo experimento, com nove tratamentos e cinco repetições, no qual J2 de *M. javanica* foram tratados com 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24% de manipueira. Os mesmos estudos foram feitos para *M. enterolobii* e *M. exigua*.

Em todos os experimentos, cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio de 5mL de capacidade, no qual foram depositados 02 mL de suspensão aquosa contendo 500 J2 de *Meloidogyne* spp. + 02 mL da solução de manipueira. Os tubos foram deixados à temperatura de $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, com posterior quantificação dos nematoides vivos e mortos, em câmara de Peters.

Para confirmar se os J2 estavam realmente mortos, foi adicionado, em cada tubo, um mililitro de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1N. Foram considerados vivos aqueles nematoides que apresentavam mobilidade natural e mantiveram a sua forma original e, mortos, aqueles imóveis, deformados ou que apresentaram aspecto incomum.

Com base nos dados obtidos nas avaliações, a porcentagem de mortalidade foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$PM = \frac{NIM \times 100}{500}$$

Em que:

PM = Porcentagem de Mortalidade; NIM = Número de Indivíduos Mortos.

Em todos os experimentos, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Com o objetivo de estipular a concentração letal mediana CL_{50} , foi feita a análise de Probit (Finnet, 1971), na qual os valores de mortalidade foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott (1925), conforme descrito a seguir:

$$Mc(\%) = \frac{\%Mo - \%Mt}{100 - \%Mt} \times 100, \text{ em que:}$$

Mc = Mortalidade corrigida; Mo = Mortalidade observada; Mt = Mortalidade na testemunha.

Com os resultados encontrados, a concentração letal (CL_{50}) foi estimada e os dados de mortalidade foram analisados por meio de regressão de Probit, utilizando o programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Nos casos em que não houve significância da regressão de Probit, fez-se outras análises de regressão, cujos modelos foram escolhidos com base no coeficiente de regressão (R^2) e significância do coeficiente de regressão β_1 .

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CIANETO NA MANIPUEIRA

Após 24 horas da extração, os valores obtidos na solução de manipueira pura armazenada em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), e utilizada em todos os experimentos, foi de 30 mg.L^{-1} . Tais resultados corroboram com os encontrados por Takahashi e Cereda (1986), Ponte (1992), Cereda (2001), Nasu (2008) e Nasu et al. (2010), que ao estudarem a composição química da manipueira observaram teores de CN^{-} variando de 22 a 46 mg.L^{-1} , também após 24 horas da extração.

A composição da manipueira é altamente variável, devido a diferentes variedades de mandioca utilizadas no processo de fabricação da farinha e, também, das diferentes condições edafo-climáticas do local onde foi cultivada. Assim, os valores de cianeto livre (CN^{-}) observados na manipueira utilizada neste experimento estão de acordo com a faixa de variação dos teores encontrados pelos demais autores.

6.2 PERSISTÊNCIA DO CIANETO E AVALIAÇÃO DO pH EM MANIPUEIRA

Os teores de CN^{-} determinados neste trabalho variaram de 3 a 30 mg.L^{-1} , tanto para a manipueira armazenada a temperatura ambiente quanto para a armazenada em refrigerador $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$, conforme apresentado na Figura 1.

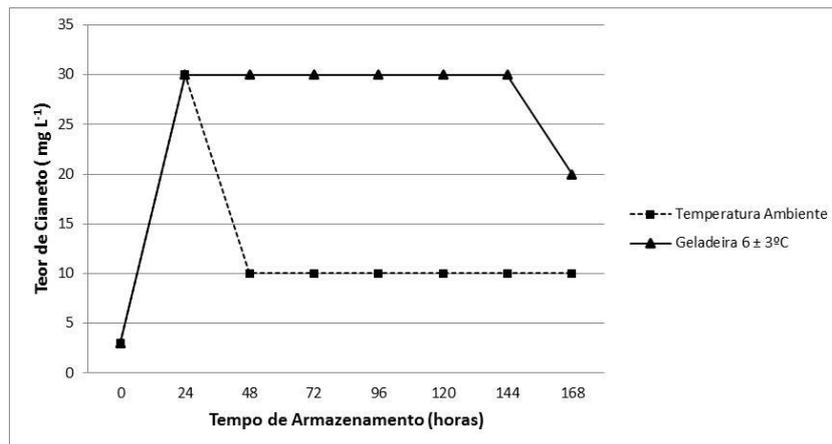


Figura 1. Variação do teor de cianeto presente na manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile e armazenada em temperatura ambiente e em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), durante 168 horas.

Ainda observando a Figura 1, percebe-se que a manipueira armazenada em refrigerador $6 \pm 3^{\circ}\text{C}$ apresentou maiores teores de CN^- e maior estabilidade ao longo do tempo, visto que, provavelmente, o resfriamento da solução diminuiu o metabolismo de microrganismos, o que leva, conseqüentemente, a uma menor fermentação dos carboidratos, menor liberação de enzimas e maior conservação e estabilidade da solução.

Já com relação às análises do pH, determinado logo após a extração, observa-se que a média dos valores encontrados foi 6,0; entretanto, ao longo das avaliações, observou-se a redução desse valor para 4,0 a partir das 96 horas, independente da forma de armazenamento, sendo que esse valor foi estável até a última avaliação (168 horas) (Figura 2).

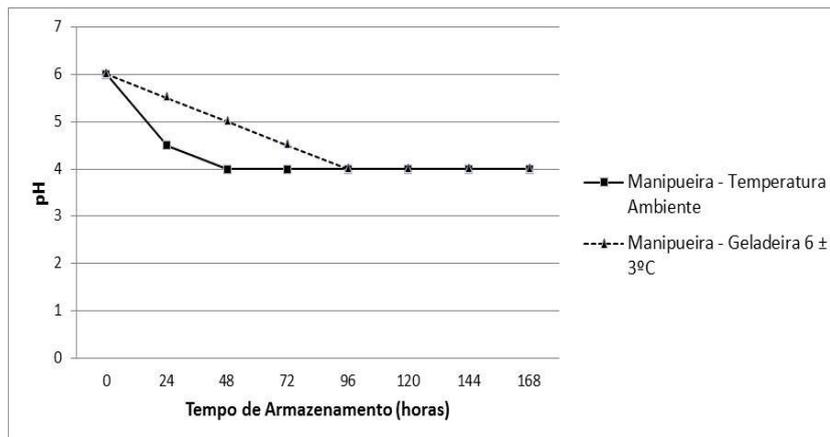


Figura 2. Variação do pH da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile e armazenada em temperatura ambiente e em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), durante 168 horas.

De acordo com Ribeiro et al., (2010), o pH inicial da manipueira, quando determinado no momento da prensagem, situa-se em torno de 6,0 e, momentos após, percebe-se a redução desses valores, corroborando com os dados obtidos neste experimento.

Resultados similares foram encontrados por Ferreira et al., (2001), que, após análise da manipueira fresca extraída de mandioca branca e amarela, constataram pH 6,30 e 6,15, respectivamente. Entretanto, após 48h de armazenamento da manipueira, o pH das amostras reduziu para 3,87 e 3,46, respectivamente, atingindo estabilidade de 3,83 e 3,40, após 78h.

De acordo com Leonel e Cereda (1995), o pH da manipueira, quando analisado nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após a extração, apresentou pH de 6,2, inicialmente, decaindo para pH 4,0, após 24 horas de repouso, se estabilizando em pH 3,6 a partir das 48 horas.

Analisando as Figuras 3 e 4, observa-se que nas primeiras horas de armazenamento da manipueira ocorre a elevação dos teores de cianeto livre. O mesmo foi relatado por Leonel et al., (1991), o qual afirma, ainda, que a redução dos valores de pH podem se justificar pelo aumento da concentração do glicosídeo tóxico denominado linamarina, do qual se origina o ácido cianídrico.

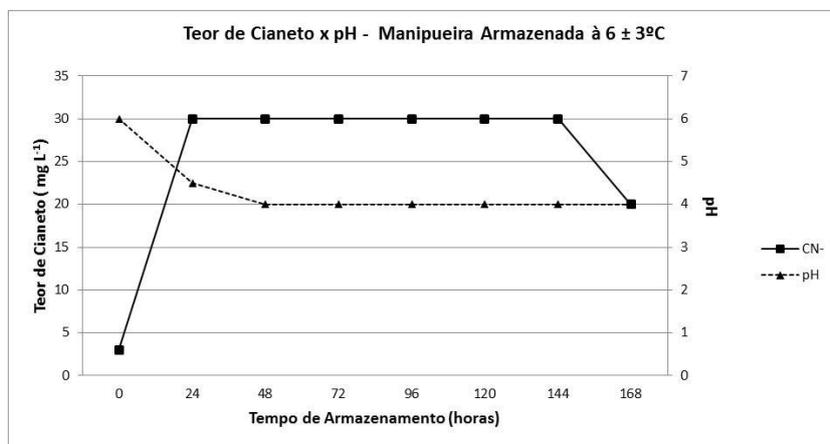


Figura 3. Relação da variação do teor de cianeto com o pH da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile e armazenada em refrigerador ($6 \pm 3^{\circ}\text{C}$), durante 168 horas de avaliação.

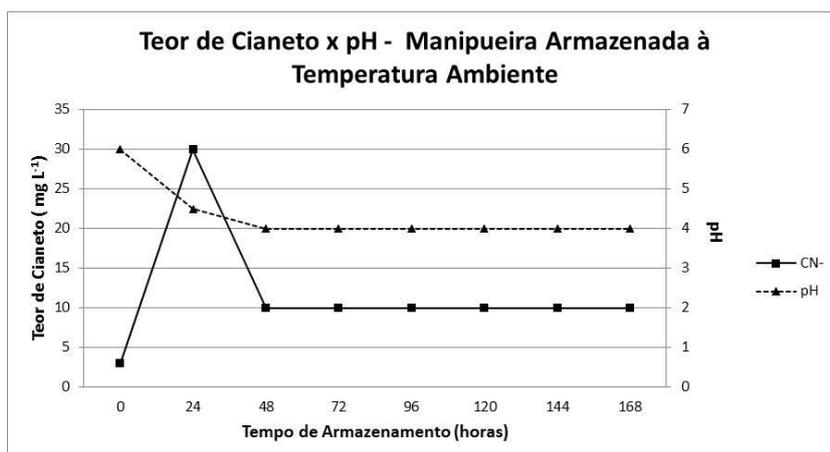


Figura 4. Relação da variação do teor de cianeto com o pH da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile armazenada à temperatura ambiente, durante 168 horas de avaliação.

6.3 EFEITO DA MANIPUEIRA SOBRE A MORTALIDADE DE *Meloidogyne* spp. em teste *in vitro*.

6.3.1 *M. javanica*

Os tratamentos com manipueira, a partir de 30 mg.L⁻¹ de CN⁻ em manipueira pura, foram efetivos na mortalidade de *M. javanica*, causando a morte de 100% dos J2 tratados, mas não diferindo estatisticamente entre si nas concentrações 25, 50, 75 e 100%; sendo, entretanto, superiores à testemunha positiva (água) (Figura 5).

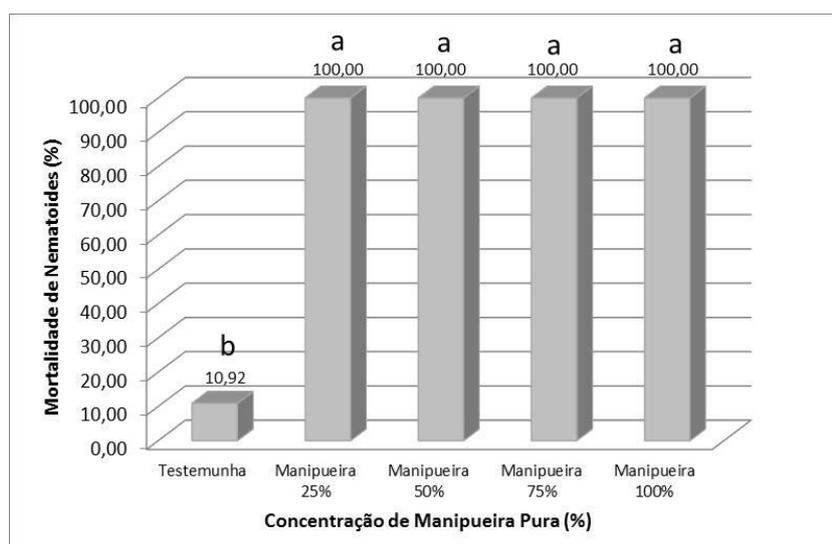


Figura 5. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre *Meloidogyne javanica*.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Visto que, conforme observado anteriormente, a menor concentração de manipueira (25%) provocou 100% de mortalidade dos J2, um novo ensaio, com concentrações ainda menores de manipueira (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24%) foi realizado, a fim de se identificar o nível mínimo de toxicidade do resíduo sobre *M. javanica*.

Ao observar a figura 6, percebe-se que a manipueira causou a morte de 100% dos J2 de *M. javanica* nas concentrações superiores à 15%, diferindo estatisticamente entre si das concentrações 3, 6, 9 e 12%, mas não das de 18, 21 e 24%. Todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística quando comparadas à testemunha positiva (água), evidenciando a toxicidade da manipueira sobre *M. javanica*. As concentrações de 3, 6, 9 e 12% de manipueira provocaram a morte de 16,00; 25,68; 41,76 e 72,36%, respectivamente, de J2 (Figura 6).

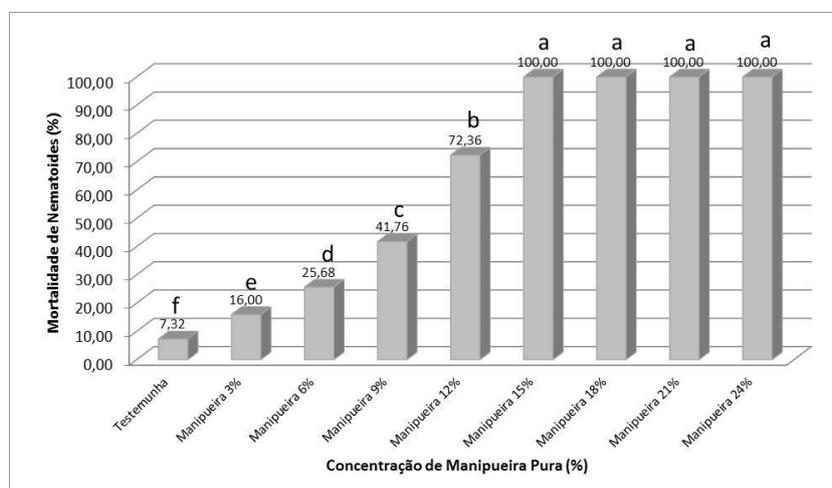


Figura 6. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne javanica*.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de Probit, para estimativa da concentração letal (CL_{50}), os dados não se adequaram ao modelo por ter apresentado um χ^2 significativo (99,346) e uma elevada heterogeneidade dos dados (16,558).

Assim, optou-se por fazer análise de regressão para determinação da equação de dose/resposta dos diferentes tratamentos e, posteriormente, estimativa da concentração letal (CL_{50}), conforme apresentado na Figura 7.

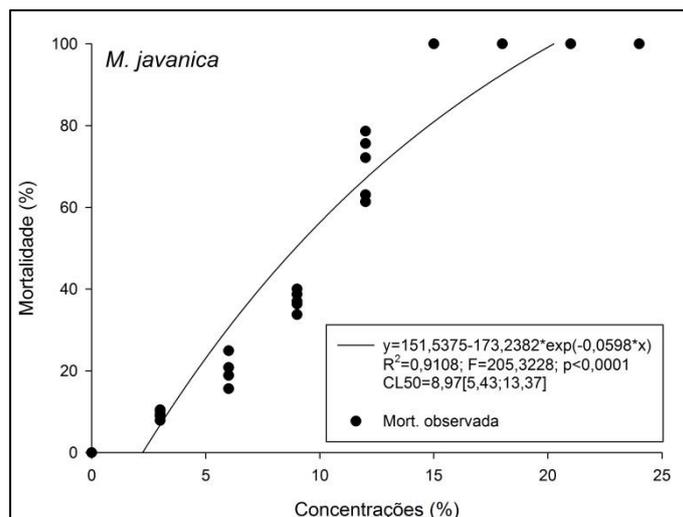


Figura 7. Concentração Letal mediana (CL_{50}) da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile, diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne javanica*, após correção de mortalidade pela fórmula de Abbott (1925).

O modelo que melhor se ajustou aos dados foi o exponencial, no qual foi gerada a equação ' $y = 151,5375 \cdot \exp(-0,0598 \cdot x)$ ', sendo que, através dela, obteve-se CL_{50} de 8,97, ou seja, partindo-se de 30 mg.L^{-1} de CN^- em manipueira pura, a concentração de 8,97% desse resíduo ocasiona a mortalidade de 50% dos J2 de *M. javanica*, com intervalo de segurança entre 5,43 e 13,37%.

A toxicidade apresentada pela manipueira sobre o nematoide possivelmente ocorre pela presença do ácido cianídrico originado da linamarina (GONZAGA, 2008; FURLANETTO, 2011).

6.3.2 *M. enterolobii*

Todos os tratamentos com manipueira, partindo-se de 30 mg.L^{-1} de CN^- , causaram 100% de morte dos J2 tratados, sendo que as médias para as concentrações 25, 50, 75 e 100% foram estatisticamente iguais, mas superiores à da testemunha (água). Os resultados observados corroboram com

os encontrados na análise da toxicidade da manipueira sobre *M. javanica*, anteriormente apresentados.

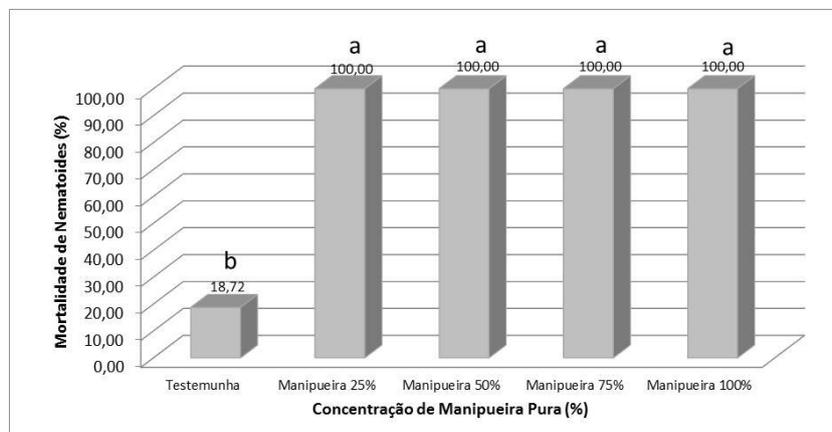


Figura 8. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne enterolobii*.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como a menor concentração de manipueira (15%) já provocou a morte de 100% dos J2, um novo ensaio, com concentrações menores foi realizado, conforme descrito para *M. javanica* no item 6.3.1.

A partir da concentração de 21%, a manipueira provocou a morte de 100% dos J2, não diferindo estatisticamente das concentrações 15 e 18%, as quais promoveram 91,36 e 97,80% de mortalidade, respectivamente. Todas as concentrações foram superiores à testemunha positiva (água) no que tange à morte dos nematoides. Houve mortalidade de 34,68; 48,00; 63,32 e 75,52% para as concentrações de 3, 6, 9 e 12% de manipueira, respectivamente, sendo estas estatisticamente diferentes entre si (Figura 8).

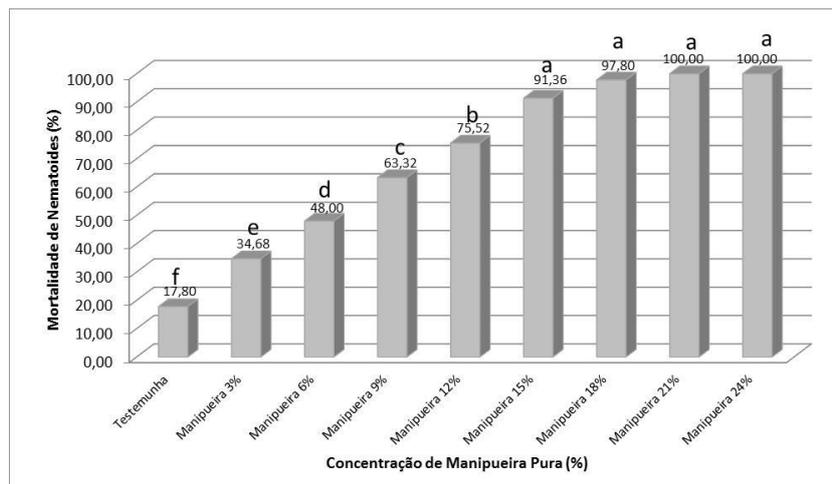


Figura 9. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne enterolobii*.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para estimativa da concentração letal (CL_{50}) para *M. enterolobii*, os dados não se adequaram ao modelo de Probit por ter apresentado um χ^2 significativo (79,047) e uma elevada heterogeneidade dos dados (13,175). Por isso, foi feita análise de regressão para a determinação da equação de dose/resposta dos diferentes tratamentos e, posteriormente, a estimativa da concentração letal (CL_{50}), conforme apresentado na Figura 10.

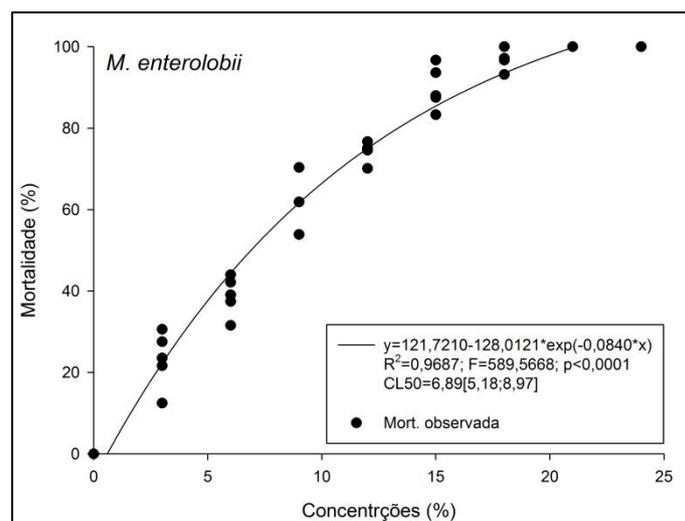


Figura 10. Concentração Letal mediana (CL_{50}) da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile, diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne enterolobii*, após correção de mortalidade pela fórmula de Abbott (1925).

Através do modelo de regressão exponencial, o qual se ajustou melhor aos dados, foi gerada a equação ' $y=121,7210-128,0121*\exp(-0,0840*x)$ '. Através da equação obteve-se uma CL_{50} de 6,89, ou seja, partindo-se de 30 mg.L^{-1} de CN⁻ em manipueira pura, concentrações de 6,89% de manipueira ocasionam a mortalidade de 50% dos J2 de *M. enterolobii*, com intervalo de segurança entre 5,18 e 8,97%.

Observa-se que, em comparação aos dados obtidos para *M. javanica*, *M. enterolobii* apresenta maior sensibilidade à toxicidade provocada pela manipueira, visto que menores concentrações promoveram a mortalidade de 50% dos J2 tratados. O ácido cianídrico é o possível componente tóxico aos nematoides, levando-os a morte (GONZAGA, 2008; FURLANETTO, 2011).

6.3.3 *M. exigua*

As concentrações de 50, 75 e 100% de manipueira acarretaram a morte de 100% dos J2 de *M. exigua*, já 25% do resíduo matou 93,92% do patógeno. Todos os tratamentos foram superiores em eficiência quando comparados à testemunha (Figura 9).

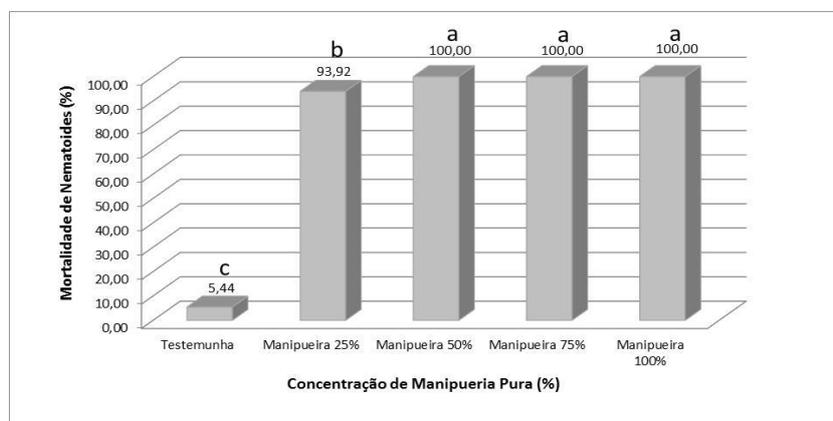


Figura 11. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne exigua*.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Seguindo a mesma tendência dos experimentos anteriores, realizou-se um novo ensaio, com concentrações menores.

As concentrações 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24% de manipueira foram responsáveis por 16,32; 21,00; 49,92; 66,96; 83,60; 89,04; 92,72 e 93,16% de mortalidade do nematoide (Figura 10).

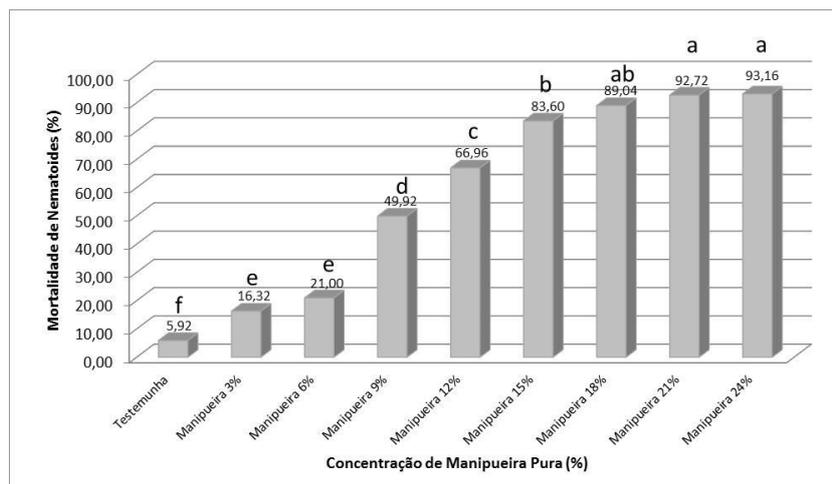


Figura 12. Efeito da toxicidade da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne exigua*.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como para os nematoides anteriores, os dados não se adequaram ao modelo de Probit por ter apresentado um χ^2 significativo (39,846) e elevada heterogeneidade dos dados (6,6411), para a estimativa da concentração letal (CL_{50}) de *M. exigua*. Por isso, para se determinar a equação de dose/resposta dos diferentes tratamentos e, posteriormente, a estimativa da concentração letal (CL_{50}), foi feita análise de regressão.

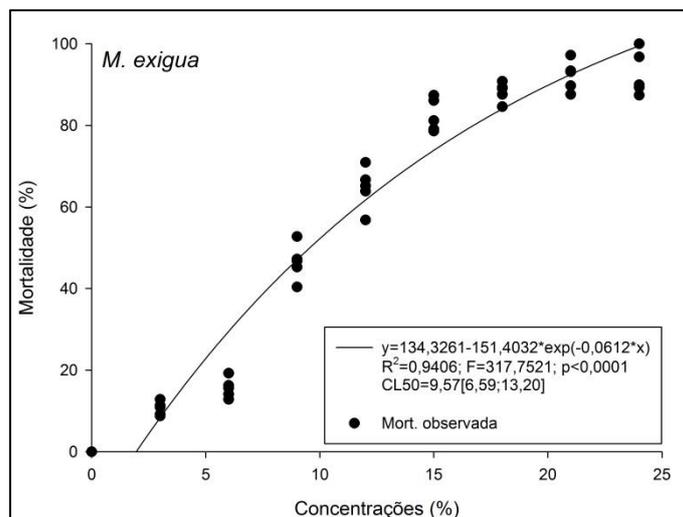


Figura 13. Concentração Letal mediana (CL_{50}) da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile, diluída a diferentes concentrações sobre o nematoide *Meloidogyne exigua*, após correção de mortalidade pela fórmula de Abbott (1925).

Através da equação que melhor representou os ($y=134,3261-151,4032 \cdot \exp(-0,0612 \cdot x)$), foi determinada a CL_{50} de 9,57, ou seja, partindo-se de 30 mg.L^{-1} de CN em manipueira pura, concentrações de 9,57% de manipueira ocasionam a mortalidade de 50% dos indivíduos de *M. exigua*, com intervalo de segurança entre 6,59 e 13,20%.

Observa-se que, em comparação aos dados obtidos para *M. javanica* e *M. enterolobii*, *M. exigua* apresenta uma maior resistência à toxicidade provocada pela manipueira, visto que foram necessárias maiores concentrações de manipueira para ocasionarem a mortalidade de 50% do J2, conforme observado na Figura 14.

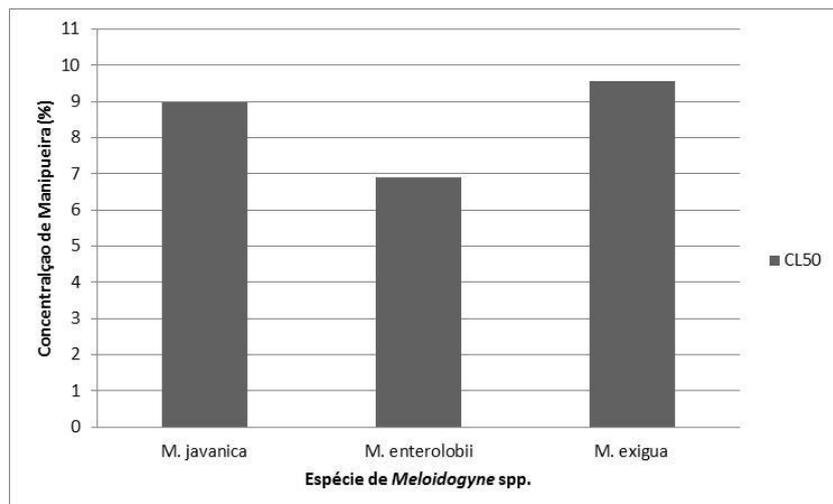


Figura 14. Concentração Letal mediana (CL₅₀) da manipueira extraída de mandioca 'brava' cv. Pão do Chile, diluída a diferentes concentrações sobre *Meloidogyne* spp., após correção de mortalidade pela fórmula de Abbott.

Os resultados obtidos nestes experimentos, para todas as espécies de *Meloidogyne* avaliadas, corroboram os de Nasu et al. (2010), que ao estudar o efeito da manipueira, em diferentes concentrações, sobre *M. exigua*, em ensaios *in vitro*, observaram que os tratamentos com manipueira pura em concentração de até 10% de diluição apresentaram 100% de mortalidade, partindo-se de 40 mg.L⁻¹ de CN⁻.

Grabowski et al. (2007), em testes *in vitro*, obtiveram resultados de 100% de mortalidade de *M. exigua* utilizando dosagens de 100, 75, 50, 25, 10 e 8% de manipueira pura, partindo-se de 40 mg.L⁻¹ de cianeto.

Alves et al. (2006), testaram a manipueira pura nas concentrações de 100, 80, 60, 40 e 20%, em ensaios *in vitro*, para o controle do nematoide da casca preta do inhame, *Scutellonema bradys* (Steiner e Le Hew) Andrásy, e constataram que após 48 horas as dosagens iguais ou superiores a 40%, proporcionaram 100% de mortalidade do nematoide. Entretanto, os autores não revelaram a concentração de cianeto na manipueira utilizada.

Estudos que demonstrem o modo de ação da manipueira sobre *Meloidogyne* spp., são necessários. Os óleos essenciais, por exemplo, podem interferir na atividade metabólica dos nematoides promovendo a desorganização ou

inibição das funções vitais desde o início do desenvolvimento embrionário, como também na sua movimentação, que pode ser em razão da alteração da permeabilidade da membrana celular e desestruturação do sistema nervoso (OKA et al., 2000 e SALGADO et al., 2003).

De acordo com Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais, ao entrarem em contato com a membrana citoplasmática, podem promover a ruptura da estrutura de polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídios, provocando a despolarização da membrana, como as das mitocôndrias, resultando na liberação de íons de cálcio e proteínas.

Outros autores, como Bruni et al. (2004), atribuem a ação nematicida dos óleos essenciais à presença de fenóis, aldeídos e álcoois que promovem a oxidação de membranas. Pérez et al. (2003) observaram que a medida que as concentrações dos óleos essenciais foram aumentadas, houve maior porcentagem de mortalidade de J2 *M. artiellia*. Segundo Echeverrigaray et al. (2010), J2 de *M. exigua*, após entrarem contato com monoterpenoides α -pineno, geraniale, citral e citronelal, não conseguiram recuperar a mobilidade quando incubado em água novamente, demonstrando o efeito nematicida desses compostos que também estão presentes nos óleos essenciais testados.

O efeito nematicida da vinhaça sobre fitonematóides também já foi comprovado e ocorre devido à liberação de nitrogênio amoniacal no solo, tóxico ao nematoide, e por estimular a flora microbiana antagônica aos fitonematóides (RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1986; KAPLAN et al., 1992). Além disso, alguns autores relatam também que a vinhaça estimula o desenvolvimento de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PRPG), promovendo maior rendimento das culturas, além de poderem mediar a resistência sistêmica induzida (RSI) das plantas aos patógenos (BROWN & KERRY, 1987; CHEN et al. 2000, AKHTAR e MALIK, 2000).

No tocante ao modo de ação dos nematicidas, amplamente utilizados em todo o mundo, Freitas et al., (2008) mencionam que os fumigantes inibem o sistema enzimático dos nematoides, mas não os mata diretamente, já os não fumigantes inibem a acetilcolinesterase, responsável pela transmissão de

estímulos, isto é, os nematoides afetados não se alimentam ou locomovem enquanto durar seu efeito e morrem por inanição. O efeito desse último grupo de nematicidas pode durar entre 2 e 3 meses.

No presente estudo, os testes *in vitro* para *M. javanica* e *M. enterolobii*, evidenciaram que os tratamentos com manipueira até 15% de diluição ocasionaram a morte de 100% dos J2 tratados. Para *M. exigua*, tais resultados foram obtidos nos tratamentos com manipueira até 50% de diluição, partindo-se, para todos os testes, de 30 mg.L⁻¹ de cianeto em manipueira pura. Talvez um ou mais dos mecanismos de ação mencionados acima estejam relacionados a morte de *Meloidogyne* spp. tratado com manipueira.

7 CONCLUSÃO

A manipueira apresentou toxicidade a *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua*, independente da concentração de manipueira pura avaliada, indicando, portanto, uma possibilidade de utilização deste resíduo no manejo desses patógenos no campo. A CL₅₀ de manipueira sobre *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. exigua* foi de 8,97%, 6,89 e 9,57%, respectivamente.

8 REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, p.265-266, 1925.

AKHTAR, M; MALIK, A. **Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review.** Bioresource Technology, p. 35-47, 2000.

ALVES, E. C; SANTIAGO, A. D; ELOY, A. P; AMORIM, E. P. R. Efeito tóxico da manipueira sobre *Scutellonema bradys*, causador da “casca-preta” no inhame (*Dioscorea cayennensis*). Fitopatologia Brasileira, 31, 2006.

ALVES, F. C. Influência do parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne enterolobii* em abacaxizeiros. Tese de doutorado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

ALVES, F. R.; ZINGER, F. D.; CRUZ, T. P. da; SOUZA, R. M. de; COSTA, D. da C. **Controle biológico de fitonematoides: uma abordagem prática.** In: PRATISSOLI, D.; JESUS JÚNIOR, W. C. de; ZAGO, H. B.; ALVES, F. R.; VIANA, U. R.; SANTOS JÚNIOR, H. J. G. dos. (Ed.). Tópicos especiais em produção vegetal III. Alegre: UFES, Centro de Ciências Agrárias, p.238-278, 2012.

BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils: a review.** **Food and chemical toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BARCELOS, F. F. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes de *Mucuna aterrima*. Dissertação de Mestrado. Viçosa: UFV, p.93, 1997.

BATALHA, B. L. (Org.). Glossário de engenharia ambiental. Brasília: Ministério do Interior – Secretaria Especial do Meio Ambiente, 1988.

BONETTI, J. I; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Porto Alegre, p.553, 1981.

BROWN, R. H; KERRY, B. R. Principles and practice of nematode control in crop. Orlando: Academic Press Inc, p.421, 1987.

BRUNI, R; MÉDICI, A; ANDREOTTI, E; FANTIN, C; MUZZOLI, M; DEHESA, M; ROMAGNOLI, C; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemical**, v.85, n.4, p.415-421, 2004.

BUENO G., F., ALMEIDA, C. B. de; DEL BIANCHI, V. L. Degradação da manipueira utilizando reator de lodo ativado em batelada sequencial com elevado tempo de paralização intermitente da aeração. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.6, p.256-263, 2010.

CAMPOS, V. P. Doenças causadas por nematoides em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.) Controle de doenças de plantas – hortaliças, p. 801-841, Viçosa: UFV, 2000.

CAMPOS. V. P. Doenças causadas por nematóides. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 21-28, 1985.

CARNEIRO, R. D. G; ALMEIRA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v.25, n.1, p.35-44, 2001.

CASSONI, V.; CEREDA, M. P. Avaliação do processo de fermentação acética da manipueira. **Revista Energia na Agricultura**, v.26, n.4, p.101-113, 2011.

CASTILLO P.; LANDA B. B.; NAVAS-CORTÉS J. A.. First Report of *Meloidogyne arenaria* Parasitizing LeUuce in Southern Spain. Plant disease. v.90. n.7. 2006.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Cargill, p. 13-37, 2001.

CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, São Paulo: Fundação Cargill, p.320, 2000.

CHEN J.; ABAWI G. S.; ZUCKERMAN B. M. Suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage to lettuce grown in a mineral soil amended with chitin and 31 biocontrol organisms. Supplement to the Journal of Nematology. 31(4S):719–725. 1999.

CHEN, J; ABAWI, G. S; ZUCKERMAN, B. M. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii* and *Streptomyces costaricanus* with organic amendment against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. **Journal of Nematology**, p.70-77, 2000.

CORDEIRO, G. Q. Tratamento de Manipueira em Reator Anaeróbio Compartimentado. Dissertação de Mestrado. São José do Rio Preto: UNESP, 2006.

CORDEIRO, M. J. Z.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.99-117, 2005.

COSTA, D. da C.; PAULUCIO, V. de O.; ALVES, F. R.; CAMARA, G. de R.; RODRIGUES, L. L. Fitonematoides de importância econômica na cultura do abacaxi. In: TOMAZ, M. A.; AMARAL, J. F. T. do; OLIVEIRA, F. L. de; COELHO, R. I. Tópicos especiais em produção vegetal IV. Alegre: UFES, Centro de Ciências Agrárias, p.276-292, 2013.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FURLANETTO, C.; SANTANA, S. de M.; BARIZÃO, D. A. O.; RIBEIRO, R. C. F.; FORMENTINI, H. M. Fitonematoides associados a frutíferas na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2010.

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

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot Nematodes: Meloidogyne species and races. In: NICKLE, W. R. (Ed.). Manual of Agricultural Nematology, , New York, p.281–286. 1991.

FERRAZ, L. C. C. B; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIM FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**, v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, p.168-201, 2005.

FERREIRA, W. A; BOTELHO, S. M; CARDOSO, E. M. R; POLTRONIERI, M. C. **Manipueira**: um adubo orgânico em potencial. Documento 107. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001.

FINNEY, D. J. Probit analysys. London: Cambridge University Press, p.25, 1971.

FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Cargill, p. 13-37, 2001.

FIORETTO, R. A; BRINHOLI, O. Possibilidade de controle de plantas invasoras com a aplicação de manipueira. Energia na Agricultura, p. 3-9, 1985.

FREIRE, F. das C. O. **Uso da manipueira no controle de oídio na cerigueleira**: resultados preliminares. Comunicado técnico, n.70. Fortaleza: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001.

FREITAS, L. G.; LIMA, R.; D'ARC, F. S. Introdução à nematologia. Cadernos didáticos, n. 58, p.90, Viçosa: UFV, 2009.

FURLANETTO, C; ESTEVES, R. L; COMERLATO, A. P; NASU, E. G. C; FORMENTINI, H. M. **Manipueira**: um potente nematicida no controle de nematoides. Anais – 29º congresso brasileiro de nematologia. p.114-119, UNB: 2011.

GONZAGA, A. D.; GARCIA, M. V. B.; SOUZA, S. G. A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R. S.; RIBEIRO, J. D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). Acta Amazônica, v. 38, n. 1, p.101-106, 2008.

GRABOWSKI, M. M. S. Efeito *in vitro* da manipueira produzida na região Oeste do Paraná sobre o nematoide *Tubixaba tuxaua* e estudo da sua composição química. Monografia. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2007.

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

KAPLAN, M; NOE, J. P; HARTEL, P. G. The role of microbes associated with chicken litter in suppression of *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, p.522-527, 1992.

LEONEL, M; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Scientia Agricola. (Piracicaba, Braz.) [online]. v. 52, n. 2, p. 299-304. 1995.

LEONEL, M; HAMADA, C; CEREDA, M. P. Cultivo de *Aspergillus niger* em água residual de processamento de mandioca (manipueira). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16. Santos-SP, 1991. Anais..., p.215, 1991.

LORDELLO, L. G. E. Nematóides das plantas cultivadas. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1988.

MCMAHON, J. M; WHITE, W. L. B; SAYRE, R. T. Cyanogenesis in cassaca (*Manihot esculenta* Crantz). J Expt Bot, p.731-741, 1995.

MITKOWSKI, N. A.; ABAWI, G. S. Root-knot nematodes. *The Plant Health Instructor*, 2011.

NASU, E. das G. C. Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no Oeste do Paraná. Dissertação de mestrado. Marechal Cândido Rondon, p.74, 2008.

NASU, E. G. C; PIRES, E; FORMENTINI, H. M; FURLANETTO, C. Efeito de manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios *in vitro* e em tomateiros em casa de vegetação. Tropical Plant Pathology, vol. 35, n.1, p.32-36, 2010.

OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their componentes against the root-knot nematode. **Nematology**, v.09, n.07, p.710-715, 2000.

PEIXOTO, J. R. Melhoria de pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando a resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.103, 1995.

PÉREZ, M. P; NAVAS-CORTÊS, J. A; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J; CASTILLO, P. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. **Plant Pathology**, v.52, n.3, p.395-401, 2003.

PIMENTA, C. A. M.; CARNEIRO, R. M. D. G. Utilização Pasteuria penetrans em controle biológico de *Meloidogyne javanica* em duas culturas sucessivas de alface e tomate. Brasília: EMBRAPA, p.36, 2005.

PINOCHET, J. Management of plant parasitic nematodes in Central America - The Panama Experience. In: VEECH, J.A. e DICKSON, D.W. (Eds.). Vistas on Nematology. Maryland: Society of Nematologists, p.105-113. 1987.

PONTE, J. J. **Cartilha da manipueira**: uso do composto como insumo agrícola. Fortaleza: Governo do Estado do Ceará. Secretaria da Ciência e Tecnologia (SECITECE), 1999.

PONTE, J. J. da. Histórico das pesquisas sobre utilização da manipueira (extrato líquido de raízes de mandioca) como defensivo agrícola. Fitopatologia Venezuelana, v.5, n.2, p.2-5, 1992.

PONTE, J. J. da. **Uso da manipueira como insumo agrícola**: defensivo e fertilizante. In: CEREDA, M. P. Manejo uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, p.80-85, 2001.

RIBEIRO, J. S; NEVES, O. S. C; SOUZA, A. S; VIANA, A. E. S; SANTOS, A. LIMA, D. H. N; COSTA, M. A. Determinação da composição química da manipueira produzida na microrregião de Vitória da Conquista-Ba. Anais.. IV Encontro de Química da Bahia. Barreiras, de 3 a 5 de setembro de 2010.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. **Nematoides:** bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, p.1289-1296, 2010.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *Journal of Nematology*, p.192-135, 1986.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. *Ciências Agrotécnicas*, v.27, n.2, p.249-254, 2003.

SANTOS, H. S.; SCAPIM, C. A.; MACIEL S. L.; VIDA, J. B.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. DE F.; BRANDÃO FILHO, J. U. T. Patogenicidade de *Meloidogyne javanica* em alface em função do tamanho de células de bandeja e idade de 34 transplante das mudas. *Acta Sci. Agron. Maringá*, v. 28, n. 2, p. 253-259. 2006.

SANTOS, J. S; LIMA, V. L. A; BORGES JÚNIOR, J. C. F; LEDA, V. B. D.; SILVA, L. V. B. D; AZEVEDO, C. A. V. Mobilidade de solutos em colunas de solo com água residuária doméstica e de suinocultura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.14, n.11, p.1226-1233, 2010.

STOLF, E. C. Efeito de fungos endofíticos sobre o desenvolvimento de nematoides da bananeira (*Musa* spp.). Florianópolis, 2006. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/Projetos/Elaine20Cristina20Stolf202005-2.pdf>>.

TAKAHASHI, M; CEREDA, M. P. Métodos de avaliação do rendimento de manipueira na produção de metano. In: Congresso Brasileiro de Mandioca 4. Balneário Camboriú, 1986.

TIHOHOD, D. *Nematologia Agrícola Aplicada*, Jaboticabal: UNESP, p.372, 1993.

VIAENE, N. M., ABAWI, G. S. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as a cover crop. *Plant Disease*. 82:945-952. 1998.

VIAENE, N. M.; ABAWI G. S. Damage threshold of *Meloidogyne hapla* to Lettuce in Organic Soil. *Journal of Nematology*. 28(4):537-545. 1996.