

SANDRA MILENA BONILLA CASTAÑEDA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE  
CONSTITUINTES QUÍMICOS DA PARTE AÉREA  
DE *Mucuna pruriens* var. *utilis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B715c  
2015

Bonilla Castañeda, Sandra Milena, 1983-  
Caracterização e avaliação da atividade nematicida de  
constituintes químicos da parte aérea de *Mucuna pruriens*  
var. *utilis* / Sandra Milena Bonilla Castañeda. - Viçosa, MG,  
2015.  
ix, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Antônio Jacinto Demuner.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 63-68.

1. *Mucuna pruriens*. 2. Plantas antagônicas.  
3. Nematóides. 4. Controle biológico. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de  
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 632.6257

SANDRA MILENA BONILLA CASTAÑEDA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE  
CONSTITUINTES QUÍMICOS DA PARTE AÉREA  
DE *Mucuna pruriens* var. *utilis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2015.

---

Wagner Campos Otoni

---

Antônio Leis Pinheiro

---

Luiz Cláudio de Almeida Barbosa  
(Coorientador)

---

Antônio Jacinto Demuner  
(Orientador)

*A Deus, fonte de infinita misericórdia e amor,  
à minha família, amigos e em especial aos  
meus pais e irmão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser sempre meu guia e protetor, e por me mostrar seu imensurável amor com todas as bênçãos recebidas na minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho, e ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), pela disponibilização da infraestrutura para realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores Antônio Jacinto Demuner e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela orientação.

Aos meus colegas Elyabe Matos e Gabriella Moura pela colaboração na realização deste trabalho.

À professora Rosângela Oliveira do laboratório de nematologia do Departamento Fitopatologia, a Inorbert e Huarlen pela colaboração com o ensaio nematocida.

Aos técnicos José Luiz, Márcio e Cristiane, pela aquisição dos espectros.

Aos integrantes de LASA, pelo acolhimento, gentileza, colaboração, convivência agradável e amizade, especialmente a Eva, Ricardo Montanari, Diego, Izabel, Thaís, Fernanda, Gabriela, Milena e Nilton.

Aos meus colegas e amigos colombianos, Nelson e Diego, pela amizade.

À minha família, pelo apoio, que mesmo distante estava torcendo pelo meu sucesso. Aos meus amigos e irmãos Silvia Juliana Rodriguez e Alvaro Javier Patiño, por serem meu apoio e minha força nos momentos de dificuldade e por dar-me tantos momentos de alegria. Aos amigos da Colômbia pelas orações e apoio incondicional.

Aos meus queridos pais Esther Julia e Tiberio Abel, e ao meu irmão Mauricio, que são a minha fortaleza, pelo apoio, amor e sacrifício, por acreditar em mim e por estarem por perto em cada uma das minhas alegrias e fraquezas mesmo na distância.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Nematoides. ....	2
1.2 <i>Mucuna</i> sp. ....	4
1.3 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas .....	8
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
2.1 Obtenção do material vegetal .....	10
2.2 Generalidades metodológicas .....	10
2.3 Obtenção do extrato dos exsudados radiculares .....	12
2.4 Obtenção do extrato metanólico: .....	13
2.5 Obtenção de frações e compostos puros. ....	15
2.5.1 Fração em diclorometano.....	15
2.5.1.1 Análise do triacilglicerol.....	15
2.5.2 Fração de metanol .....	16
2.5.3 Fração em acetato de etila .....	16
2.5.3 Dados físicos e experimentais das substâncias isoladas de <i>Mucuna pruriens</i> .....	18
2.5.3.1. Triacilglicerol .....	18
2.5.3.1. Glutinol.....	19
2.5.3.1. Estigmasterol .....	20
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
3.1 Elucidação estrutural do triacilglicerol.....	22
3.2 Elucidação estrutural do glutinol .....	28
3.3 Elucidação estrutural do estigmasterol .....	33
3.4 Caracterização das frações D <sub>(10)</sub> 2, D <sub>(10)</sub> 4, A <sub>(34DA310)</sub> 2, e A <sub>(34DA3)</sub> 11.....	39
3.5 Caracterização das frações M <sub>(1)</sub> 1 e M <sub>(1)</sub> 2.....	45
3.6 Caracterização da fração M <sub>(1)</sub> 4 .....	51

3.7	Caracterização do extrato e das frações LA e LM dos exsudados radiculares de <i>Mucuna pruriens</i> .....	56
3.8	Avaliação da atividade nematicida.....	59
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida.
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Desvio padrão
$\delta$	Deslocamento químico
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
$J_2$	Juvenil de segundo estágio
LC	Cromatografia líquida
ESI	Ionização por eletrospray
MS	Espectrometria de massas
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mS	Milisimens
m/z	Massa/carga
ppm	Partes por milhão
$R_f$	Fator de retenção
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
$T_f$	Temperatura de fusão
t	Triplete
$t_r$	Tempo de retenção

## RESUMO

BONILLA CASTAÑEDA, Sandra Milena, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2015. **Caracterização e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos da parte aérea de *Mucuna pruriens* var. *utilis*.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Marcelo Henrique dos Santos.

Os nematoides causam grandes prejuízos em culturas agrícolas em todo o mundo. O seu controle é realizado com o uso de produtos químicos de alta toxicidade para o homem, os animais e o meio ambiente. Por isso, tem-se buscado alternativas de controle, dentre estas o uso de plantas antagônicas. Uma das plantas antagônicas mais utilizadas pertence ao gênero *Mucuna*. Portanto, neste trabalho foi proposto um estudo dos metabólitos secundários presentes na parte aérea e nos exsudados das raízes de *Mucuna pruriens* var. *utilis*. A identificação destes compostos foi realizada pela primeira vez utilizando-se cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas com ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Os compostos identificados foram adenosina, isoschaftosideo, isovitexina, rhoifolina e luteolina. Todos os compostos isolados foram caracterizados por espectroscopia no IV, espectrometria de massas, espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Tanto os extratos como as substâncias isoladas e identificadas (glutanol, estigmasterol e triacilglicerol) foram submetidas a ensaios de atividade sobre o nematoide *Meloidogyne javanica* um dos mais agressivos para culturas de grande valor comercial como soja, arroz, e aveia entre outras, obtendo-se como resultado uma atividade moderada. A exceção das frações que apresentam entre seus constituintes ácidos graxos, e flavonoides provenientes do extrato metanólico da parte aérea e a fração em acetato de etila proveniente dos exsudados radiculares de *Mucuna pruriens* apresentaram porcentagens de controle acima de 90%. Este estudo proporciona informação sobre os fitoquímicos presentes em *Mucuna pruriens* e uma possível aplicação destes compostos no controle do nematoide das galhas, visto que estes apresentaram altas porcentagens de mortalidade para este gênero de nematoides.

## ABSTRACT

BONILLA CASTAÑEDA, Sandra Milena, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Characterization and evaluation of the nematicide activity of chemical constituents of the aerial part of *Mucuna pruriens* var *utilis*.** Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Marcelo Henrique dos Santos.

The nematodes cause significant damage in economic cultures worldwide. Its control is performed by using chemicals with high toxicity for humans, animals, and the environment. Researchers have tried their control through antagonistic plants. One of the most used antagonistic plants belongs to the genus *Mucuna*. This work proposes a study of secondary metabolites exuded from the roots of *Mucuna pruriens* var. *utilis*, through hydroponic cultivation of the plant, the identification of compounds was performed for first time using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-LC-MS/MS). The identified compounds have adenosine isoschaftoside, isovitexin, rhoifolin and luteoline; All isolated compounds were characterized by IR spectroscopy, mass spectrometry,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  spectroscopy. Both isolated substances and extracts were identified and submitted for activity tests on the nematode *Meloidogyne javanica* that is one of the most aggressive for crops as soybeans and rice, obtaining as a result a moderate activity. However, except for fractions which have among their constituent fatty acids, and flavonoids from the aerial part of the methanol extract and the fraction in ethyl acetate from the root exudates of *Mucuna* which showed control percentages above 90%. This study provides information about phytochemicals present in *Mucuna pruriens* and a possible application of these compounds in the control of nematode cyst, given that they had high mortality percentages for this kind of nematodes.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda por alimentos no mundo, os fatores que acarretam reduções em produtividades agrícolas, especialmente as doenças, devem receber prioridade nas investigações científicas. Nas regiões tropicais, por exemplo, a presença de fitonematoides, muitas vezes em solos de alta fertilidade, tem trazido elevados prejuízos aos agricultores em virtude da redução nas colheitas decorrentes da limitação do crescimento e do potencial produtivo das plantas, redução na qualidade do produto colhido e, em algumas regiões, devido à desvalorização da propriedade rural, para obtenção de crédito bancário (Sharma et al., 2014).

Quase todas as culturas sofrem com o ataque de uma ou mais espécies destes organismos os quais só se alimentam no citoplasma das células vegetais vivas (Williamson e Gleason, 2003). Em tais situações, a produção de alimentos e de outros produtos agrícolas é sempre severamente afetada, por isso precisa-se de esforços no controle destes fitonematoides a fim de reduzir as perdas de produtividade (Kayani et al., 2013).

No Brasil, dentre os fitonematoides mais importantes encontram-se os do gênero *Meloidogyne* e *Heterodera* que causam, respectivamente, galhas e cistos e abrangem cerca de 30 espécies, atacando quase todas as culturas (Akhtar e Malik, 2000). A importância destes gêneros é devido à sua ampla distribuição, polifagia, diferenciação biológica ligada ao parasitismo entre a população da mesma espécie e alta capacidade de multiplicação durante a estação de crescimento da planta. Estas características vêm dificultando a implementação de programas de rotação e resistência de culturas, que se constituem em medidas de controle mais efetivas e viáveis para o agricultor (Akhtar e Malik, 2000). Como visto os prejuízos causados por estes fitonematoides são diversos e podem inviabilizar a utilização de grandes áreas, pois atacam raízes, bulbos, sementes e folhas tornando antieconômica a exploração de determinadas culturas, além de interagirem ou servir de vetores para outros patógenos de plantas, o que aumenta ainda mais a severidade das doenças de plantas (Luc et al., 1990; Tsai et al., 1991).

O desenvolvimento de sistemas de gestão para o controle de nematoides pode evitar o uso excessivo de pesticidas, por conseguinte, utilizar os exsudados da planta como nematicida, que pode ser liberado por volatilização ou lixiviação para o solo circundante, o que se torna um dos maiores desafios na pesquisa de agrotóxicos (Oka, 2010).

Uma das plantas mais utilizadas para controle de nematoides é a mucuna, uma leguminosa forrageira que pode diminuir a população de plantas daninhas e nematoides no solo, além de reduzir a erosão e ajudar na fixação de nitrogênio, também pode assimilar e armazenar nutrientes aumentando o rendimento nos cultivos, quando utilizada como adubo verde (Rojano-Delgado et al., 2012).

No entanto, Resende (1986) estudou o efeito de seis espécies diferentes de mucuna e mostrou que estas se comportaram como hospedeiras desfavoráveis a *Meloidogyne incognita*. Foi ressaltado pelo autor que o estudo foi baseado apenas em relação ao efeito do sistema radicular sobre os nematoides, devendo ser feitos novos estudos utilizando-se a parte aérea de mucuna.

Para a realização destes estudos têm sido utilizadas diferentes técnicas na identificação de produtos naturais em extratos brutos de Mucuna. Uma das técnicas combinadas que tem desempenhado papel fundamental é LC-ESI-MS/MS, a qual permite identificar compostos pertencentes a diferentes classes como alcaloides, flavonoides, triterpenos, dentre outros; sem, todavia, precisar do isolamento dos mesmos, facilitando este processo (Dias et al., 2012).

## **1.1 Nematoides**

O filo Nematoda é um dos maiores e mais diversos grupos de organismos. A maioria das espécies é encontrada em ecossistemas oceânicos, de água doce e do solo, e apenas um pequeno número é patógeno de animais e plantas. Estima-se que existam cerca de 4.100 espécies de nematoides parasitas de plantas. As espécies mais importantes em termos de danos agrônômicos pertencem às endoparasitas sedentários das galhas (*Meloidogyne* spp.), nematoides de cisto (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e o endoparasita migratório de lesão da raiz

(*Pratylenchus* spp.)(Humphreys-Pereira e Elling, 2014). Entre os nematoides de galhas, *Meloidogyne incognitae* *M. javanica* são as espécies mais importantes para a cultura da soja no Brasil. *M. javanica* tem ocorrência generalizada, enquanto *M. incognita* predomina em áreas cultivadas anteriormente com café ou algodão. Nas lavouras de soja atacadas por nematoides de galhas, geralmente, observam-se manchas em reboleiras, onde as plantas ficam pequenas e amareladas. As folhas das plantas afetadas, às vezes apresentam manchas cloróticas ou necroses entre as nervuras. Pode não ocorrer redução no tamanho das plantas, mas, por ocasião do florescimento, nota-se intenso abortamento de vagens e amadurecimento prematuro das plantas. Nas raízes das plantas atacadas observam-se galhas em número e tamanho variados, dependendo da suscetibilidade da cultivar e da densidade populacional do nematoide no solo. No interior das galhas, estão localizadas as fêmeas do nematoide. Estas possuem coloração branco-pérola e têm o formato de pera (Dias et al., 2010).

Nematoides endoparasitas sedentários induzem estruturas de alimentação in vivo dentro das plantas as quais servem como alimento constante. No entanto os nematoides endoparasitas migratórios se movimentam de forma intracelular nos tecidos da planta e absorvem os nutrientes das células em seu caminho de migração, levando à morte da célula e do tecido (Humphreys-Pereira e Elling, 2014).

Mais de 100 espécies de *Meloidogyne* foram registadas em diferentes partes do mundo. Dentre eles, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* são economicamente importantes e respondem por 95% de todas as infecções em plantas cultivadas. Estes são apresentados na seguinte ordem: *M. incognita* 47%, *M. javanica* 40%, *M. arenaria* e *M. hapla* 7% e 6%, respectivamente (Kayani et al., 2013).

Nematoides das galhas *Meloidogyne* spp., são os nematoides fitoparasitas mais frequentemente observados e prejudiciais para as culturas. Podem alterar a função da raiz e atuam como sumidouros de nutrientes, reduzindo assim o rendimento da cultura. O controle desses fitonematoides em sistemas de produção de culturas atualmente conta com nematicidas químicos que aplicados ao solo são

altamente tóxicos para os seres humanos e, portanto, podem contaminar as águas subterrâneas. No entanto, os temores sobre os riscos ambientais e de saúde tornam necessária a descoberta de meios alternativos para o controle biológico (Sharma et al., 2014).

O uso de cultivares resistentes a nematoides é uma das alternativas, uma vez que são ambientalmente benéficos, seguros e economicamente viáveis. Culturas resistentes também podem ser usadas como um componente de manejo integrado de nematoides integrado com outras estratégias de controle, como aditivos orgânicos no solo, controle biológico, solarização do solo, tratamento térmico, e rotação de culturas (Mukhtar et al., 2014).

## **1.2 *Mucuna* sp.**

No Brasil, as espécies de *Mucuna* mais comumente encontradas são *M. deeringiana*, *M. pruriens*, *M. cochichinensis*, *M. nivea*, *M. capitata*, *M. hassjoo*, *M. diabolica*, *M. aterrima* e *M. cinerea* sendo que as principais diferenças entre as espécies cultivadas são as características da pubescência da vagem, a cor da semente e o tempo para a colheita da vagem. Estas espécies são muito utilizadas para adubação verde e para silagem, devido à grande quantidade de matéria orgânica de fácil decomposição que produz e de sua capacidade de controlar fitonematoides. Poucos estudos químicos foram realizados neste gênero, sendo identificados isoflavonoides, antocianinas e antocianidinas, C-glicosilflavonas e L-Dopa (Demuner et al., 2003).

As sementes de mucuna são fonte de proteína crua na dieta do gado. No entanto, em animais monogástricos, esta planta produz uma diminuição no consumo de alimento e aumenta o risco de morte (Chikagwa-Malunga et al., 2009). Isto se deve ao conteúdo de metabólitos secundários como o L-Dopa, ácido fítico, taninos e saponinas, entre outros. No caso dos seres humanos o consumo de mucuna crua causa diarreia, lesões na pele e vômito. Além do conteúdo de L-Dopa, a mucuna possui altos níveis de tirosinase, podendo ser usada também no

processo de biotransformação de L-tirosina em melanina, a qual tem grande aplicação na cosmética, agricultura e medicina (Inamdar et al., 2014).

*Mucuna cochinchinensis* também tem uso na medicina tradicional para o tratamento de muitas doenças, além de pesquisas para uso farmacológico e avaliação quanto ao potencial antimicrobiano dos extratos das sementes e sua atuação como agentes controladores de patógenos (Natarajan et al., 2013).

Os medicamentos fitoterápicos podem ser uma fonte alternativa e valiosa para a descoberta de drogas anti-parkinsonianos. Compostos como estilbenos, flavonoides, catecois e terpenos podem ser os candidatos mais promissores para pesquisas futuras. Alguns compostos como baicaleína, puerarina, resveratrol, curcumina e ginsenosídeos merecem uma análise mais aprofundada em ensaios clínicos (Song et al., 2012). O tratamento para a doença de Parkinson foi investigado com o extrato aquoso de sementes de *Mucuna pruriens* (L.), erva medicina tradicional usada na Índia desde 1500 a. C., como agente neuroprotetor e foi observada uma redução da tirosina hidroxilase (Yadav et al., 2013).

A utilização de mucuna em sistema de rotação de culturas para reduzir os níveis populacionais de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* sp.) é uma prática que ocorre desde os anos 20 na região sudeste dos Estados Unidos (McSorley et al., 1994). Weaver e colaboradores (1994) utilizaram a *Mucuna deeringiana* e o nematicida Aldicarb para controlar *Meloidogyne arenaria* em amendoim. Os resultados indicaram que uma maior produção de amendoim foi obtida com o uso da mucuna no sistema de rotação de culturas.

Tenente (1980) classificou a mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) como planta hospedeira desfavorável a *Meloidogyne incognita* raça 3, após verificar que a planta pode ser parasitada, entretanto, somente um pequeno número de juvenis conseguiu chegar à fase adulta. A mucuna-preta foi também considerada hospedeira desfavorável a *M. incognita* raça 4 (Tenente e Lordello, 1987) a *M. incognita* raça 2 (Jaehn, 1993). Santos e Ruano, (1987) afirmaram que *Mucuna* spp., *Crotalaria* spp., *Tagetes* spp. e algumas variedades de *Avena sativa* foram materiais promissores no controle de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *Meloidogyne javanica*.

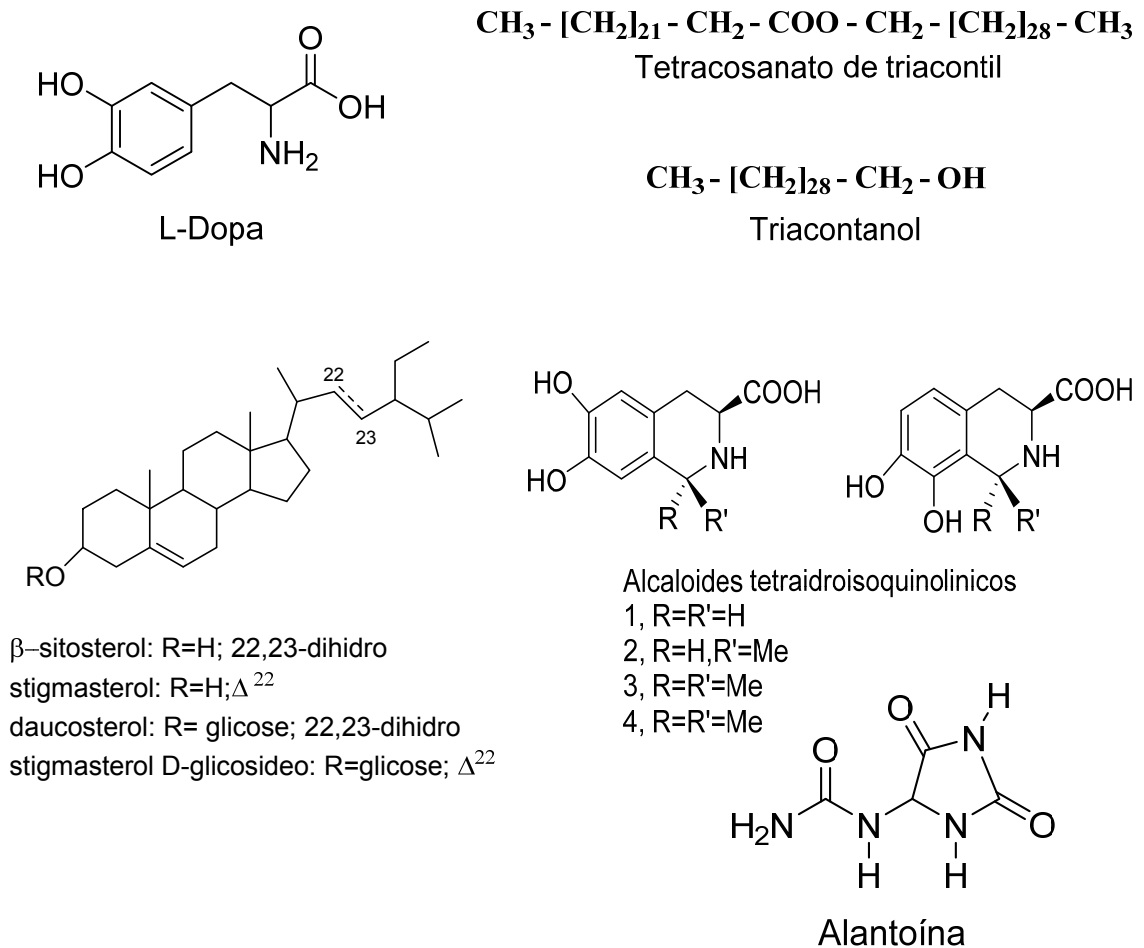
A atividade estrogênica de 12 flavonoides isolados de *Mucuna sempervirens* foi avaliada pelo ensaio de luciferase com base na linha de células de câncer humano MVLN. Os resultados indicam que as folhas de *M. sempervirens* são fonte rica em flavonoides com propriedades antioxidantes e propriedades estrogênicas para o corpo humano (Du e Li, 2012).

A *Mucuna* sp. foi utilizada para redução do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines Ichinohe*), considerado o parasita mais destrutivo dentre os que atacam a soja (Valle, 1996). Resultados obtidos em casa de vegetação mostram que a mucuna-preta é eficiente em reduzir a população deste nematoide no solo (Dias et al., 1995; Valle, 1996). No que tange a composição química, poucos estudos foram realizados no gênero *Mucuna*. As sementes de *M. pruriens* (L.) DC. são utilizadas na alimentação humana por apresentarem alto teor de proteína. Na Índia, em um estudo sobre legumes, a *M. prurita* e a *M. capitata* apresentaram teores de proteína de 32 e 36%, respectivamente (Nirajan e Katiyar, 1979).

Apesar de várias substâncias terem sido isoladas das espécies de mucuna, apenas a L-Dopa tem uma função reconhecida pelos pesquisadores até o momento, pois confere ação alelopática à mucuna contra insetos e plantas daninhas. Além disso, essa substância vem sendo testada a partir de estudos iniciais da década de 70, quanto à sua utilização em pacientes portadores do mal de Parkinson (Bell e Janzen, 1971).

A espécie *Mucuna pruriens* é utilizada na medicina tradicional indiana como planta medicinal para melhorar a fertilidade, no entanto, nenhuma validação científica até hoje foi realizada (Suresh et al., 2013). A planta é rica em alcaloides, triterpenos e esteroides presentes na raiz e sementes. As sementes também contêm proteínas, e aminoácidos, tais como L-Dopa, metionina, tirosina, lisina, glicina, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina e serina, com globulinas e albuminas, ácidos, carboidratos, e compostos relacionados, tais como o ácido oléico, ácido linoléico e ácido palmítico. A pesquisa dos extratos de caule e raízes de *Mucuna pruriens* levou ao isolamento de compostos com misturas de ácidos graxos, triacilgliceróis,  $\beta$ -sitosterol, daucosterol, estigmasterol, estigmasterol D-

glicosídeo, L-Dopa e alantoína (Barbosa et al., 1999), além de alcaloides tetraidroisoquinolínicos (Misra e Wagner, 2004) e compostos como triacosanato de triacontil e triacontanol (Nogueira et al., 1996) em suas sementes (Figura 1). Estudos de laboratório revelaram também que o extrato de sementes desta espécie possui grande quantidade de L-dopa, saponinas, D-qui-ro-Inosital e arginina (Suresh et al., 2013).



**Figura 1-** Compostos reportados na literatura para *Mucuna pruriens*.

Sementes de *M. pruriens* demonstraram efeito antiinflamatório, antipirético e antiofídico, além de atividade afrodisíaca, melhora na fertilidade, propriedades anabolizantes e antiespasmódica. É relatado que esta planta tem sido utilizada na Índia, Brasil, Espanha e Alemanha no tratamento do diabetes (Majekodunmi et al., 2011).

*M. pruriens* exsuda L-Dopa em concentração suficiente na rizosfera para inibir o crescimento de outras espécies de plantas. Este é eficazmente absorvido pelas raízes das plantas e é oxidado para as respectivas quinonas (dopaquinona e dopaminaquinona entre outros) pela polifenol oxidase ou por auto-oxidação. As quinonas são altamente reativas e podem formar ligações covalentes com as proteínas para produzir adutos cisteínicos. A formação de quinoproteínas pode perturbar o funcionamento normal das células por ligação cruzada de proteínas de membrana, desativação de enzimas e afetando a respiração mitocondrial (Mushtaq et al., 2013).

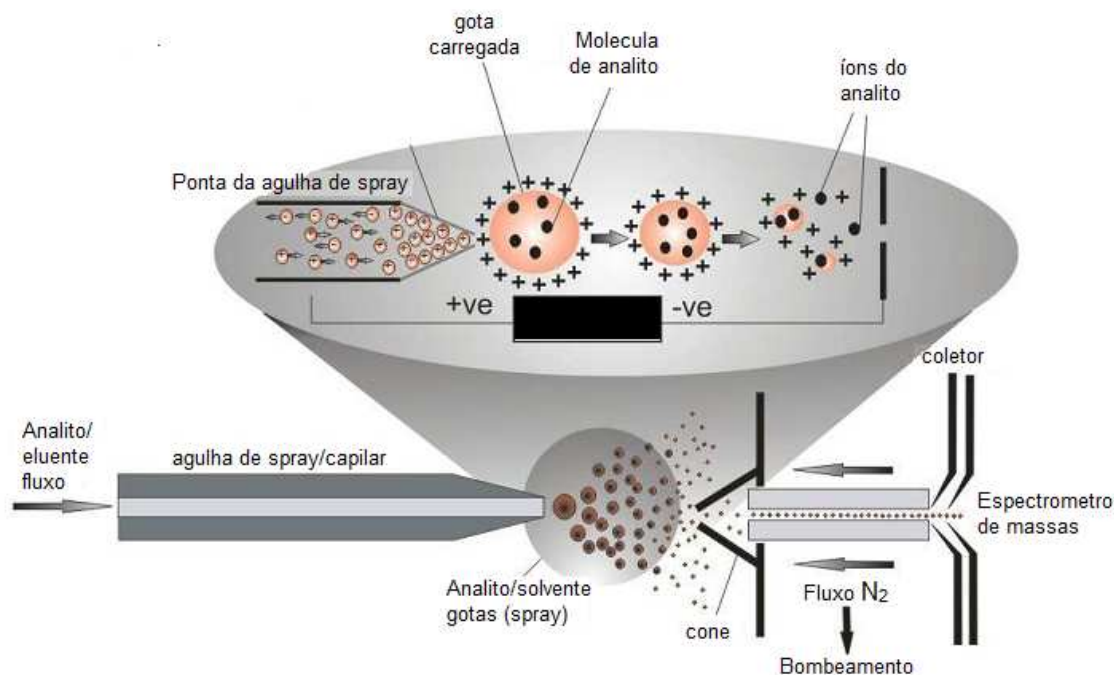
Além disso, *M. pruriens* exibe uma resistência muito elevada ao glifosato, semelhante à das plantas que tem adquirido resistência a este herbicida. Dados de [<sup>14</sup>C] do glifosato das folhas e sua translocação para os tecidos meristemáticos foram analisados. Utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura e eletroforese capilar para investigar o metabolismo capaz de degradar o herbicida. *M. pruriens* exibiu absorção e translocação limitada do glifosato, além de degradação do composto para os tecidos meristemáticos. Tendo como conclusão que a combinação de três características, ação: limitando a absorção, a translocação deficiente e degradação aumentada, são as responsáveis pela degradação do glifosato (Rojano-Delgado et al., 2012).

Os compostos que conferem atividade nematicida às plantas do gênero *Mucuna* ainda não foram caracterizados, apesar da reconhecida atividade e de sua vasta utilização como planta antagonista a nematoides e helmintos (Huisden et al., 2014).

### **1.3 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**

A espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida (LC-MS) é altamente sensível e seletivo para métodos de identificação de produtos naturais em misturas complexas. Os compostos são separados no sistema LC da coluna e são dirigidos para o espectrômetro de massa por um separador de fluxo onde são separados e ionizados no analisador de massa de acordo com a sua massa-carga ( $m/z$ ) (Dias et al., 2012).

A ionização por eletrospray é utilizada como recurso para a obtenção dos íons da solução e ela é realizada a pressão atmosférica. O efluente da coluna passa através de um capilar metálico, o qual possui uma alta voltagem. A solução proveniente do capilar encontra-se altamente carregada, levando a uma repulsão colúmbica que supera a tensão superficial dando como resultado a formação de gotas altamente carregadas, estas gotas são submetidas a dessolvatação com um gás secante (Nitrogênio), até as forças de repulsão serem maiores que as forças de coesão da tensão interfacial. Neste ponto as gotas são fissionadas em gotas menores pelo processo conhecido como “Explosão Columbica”, e os íons formados são transportados até o espectrômetro de massas através de uma série de lentes localizadoras (Figura 2) (Bae, 2007).



**Figura 2.** Representação de obtenção dos íons pela técnica de eletrospray (Dias et al., 2012).

ESI é considerado como um processo "de ionização suave", uma vez que a energia interna dos íons formados é baixa, e pouca ou nenhuma fragmentação ocorre. Esta característica é muito interessante para a identificação do peso molecular ou fórmula molecular. No entanto, ela representa inconvenientes para

estudos estruturais de elucidação, que são baseados na fragmentação dos íons. Na espectrometria de massa (MS/MS), um íon chamado de precursor selecionado a partir da primeira fase de MS é selecionado para produzir íons fragmentados, os quais são então analisados na segunda fase de MS. Por outro lado, informação estrutural importante pode ser obtida por comparação com bibliotecas espectrais (Dias et al., 2012).

Como alternativa no controle dos nematoides é importante estudar a composição química dos extratos da parte aérea e dos exsudados de *Mucuna pruriens* var. *utilis*, visando isolar e identificar os constituintes químicos responsáveis pela atividade nematicida dessa espécie. Uma vez identificado os compostos ativos pretende-se avaliar o potencial uso desses como nematicidas naturais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção do material vegetal**

Sementes de *Mucuna pruriens* var. *utilis* foram cultivadas no setor de Agroecologia da UFV. As plantas adultas em estado de floração foram coletadas e as partes separadas (caule e folhas) para obtenção do extrato metanólico.

A doação de exsicata da espécie *M. pruriens* encontra-se registrada no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa sob o número VIC 43870.

### **2.2 Generalidades metodológicas**

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) analítica foram utilizadas placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio POLYGRAM-UV254 0,20 mm MACHEREY – NAGEL (20 x 20 cm). As placas de CCD foram reveladas com vanilina, após visualização em câmara de luz ultravioleta.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000 (Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa - UFV), por meio de pastilhas de KBr contendo 1% (m/m) do composto.

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A, do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300 ( $B_0 = 7,05 \text{ T}$ ) operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os espectros foram referenciados pelo sinal do clorofórmio ( $\delta = 7,26$ ). As constantes de acoplamento escalar ( $J$ ) foram expressas em Hertz (Hz).

As análises de LC-MS (MS/MS) foram realizadas num sistema UHPLC Nexera (Shimadzu) hifenado com espectrômetro de massas ESI-QTOF maXis ETD de alta resolução (Bruker) e controlado pelo software Compass 1.5 (Bruker). Extratos e frações foram injetadas em uma coluna Shimadzu Titan da Supelco (C18,  $1,9 \mu\text{m}$ ,  $2,1 \times 100 \text{ mm}$ ) sob uma taxa de fluxo de  $200 \mu\text{L}/\text{min}$ . As fases móveis A e B (0.1% ácido fórmico em água e acetonitrila respectivamente). Foi feita uma rampa de concentração para a fase móvel iniciando com um eluente gradiente de 0-0,5 min até 5% de B onde foi mantido durante 5 min, 0,5-13 min até 100% de B durante 1 min, de 14-15 min ocorre diminuição da concentração para 5% de B onde foi mantido constante durante 5 min. Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo a uma taxa espectral de 2 Hz. Os parâmetros da fonte de íons foram definidos para 500 V e um deslocamento final de 4500 V para compensar a tensão capilar. A pressão do nebulizador foi de 2.0 bar, com um fluxo de gás seco (Nitrogênio) de  $8,0 \text{ L}/\text{min}$  e uma temperatura de  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os dados do precursor foram obtidos a uma energia de fragmentação de 30 eV. A configuração de íons mais frios foi otimizada para uma sensibilidade média na faixa de  $m/z = 40-1000$  utilizando uma solução de 5% de formiato de sódio em propano-2-ol como calibrador. A calibração de massa foi realizada pela infusão

inicial de íons precursores de 20 µL de solução de calibração e recalibrada posteriormente á obtenção dos dados brutos.

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 da Microquímica Ind. e Com. Ltda após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel e por recristalização empregando-se os devidos eluentes e solventes para cada composto. As temperaturas registradas não foram corrigidas.

### **2.3 Obtenção do extrato dos exsudados radiculares**

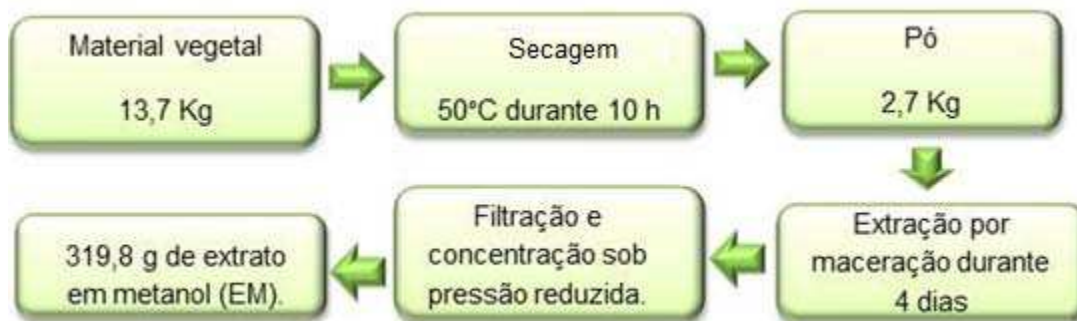
Para a obtenção dos exsudados radiculares de *M. pruriens*, foram coletadas 538 sementes que foram lavadas com uma solução 50 % de hipoclorito de sódio e colocadas em câmara de germinação a 27 °C durante 5 dias, destas só 324 sementes germinaram e foram colocadas em sistema de hidroponia em casa de vegetação, inicialmente foi colocada uma capela de plástico acima das sementes durante duas semanas até elas estarem adaptadas ao ambiente. A solução hidropônica utilizada foi composta por nitrato de cálcio, mineral misto, fosfatos, sulfato de magnésio, micronutrientes e EDTA com ferro, esta solução é utilizada no cultivo de alface, 125 mL de cada uma destas soluções foram adicionados em uma bandeja e completadas com 25 L de água. A condutividade elétrica da solução hidropônica foi monitorada durante todo o processo de crescimento das plantas, para garantir que a concentração de sais na solução fosse mantida, entre 1,65 e 2,57 mS/cm, em pH 5,5.

As plantas foram mantidas na hidroponia por 30 dias. Depois de decorrido esse tempo foram retiradas do sistema e a de solução hidropônica (50 L) foi coletada e submetida a extração líquido-líquido com acetato de etila. Cada um dos litros de solução foi extraído por triplicata com 250 mL de solvente durante 10 minutos. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e concentrada sob pressão reduzida para obter finalmente 480 mg de extrato dos exsudados radiculares.

A fase aquosa foi liofilizada fornecendo 19 g do resíduo, dos quais 9 g foram incorporados em sílica gel e utilizados para realização de coluna filtrante em sílica gel utilizando como fase móvel acetato de etila e metanol. Foram obtidas duas frações, a fração de acetato de etila (LA) com uma massa de 0,074 g e a fração de metanol (LM) com 4,28 g.

#### 2.4 Obtenção do extrato metanólico:

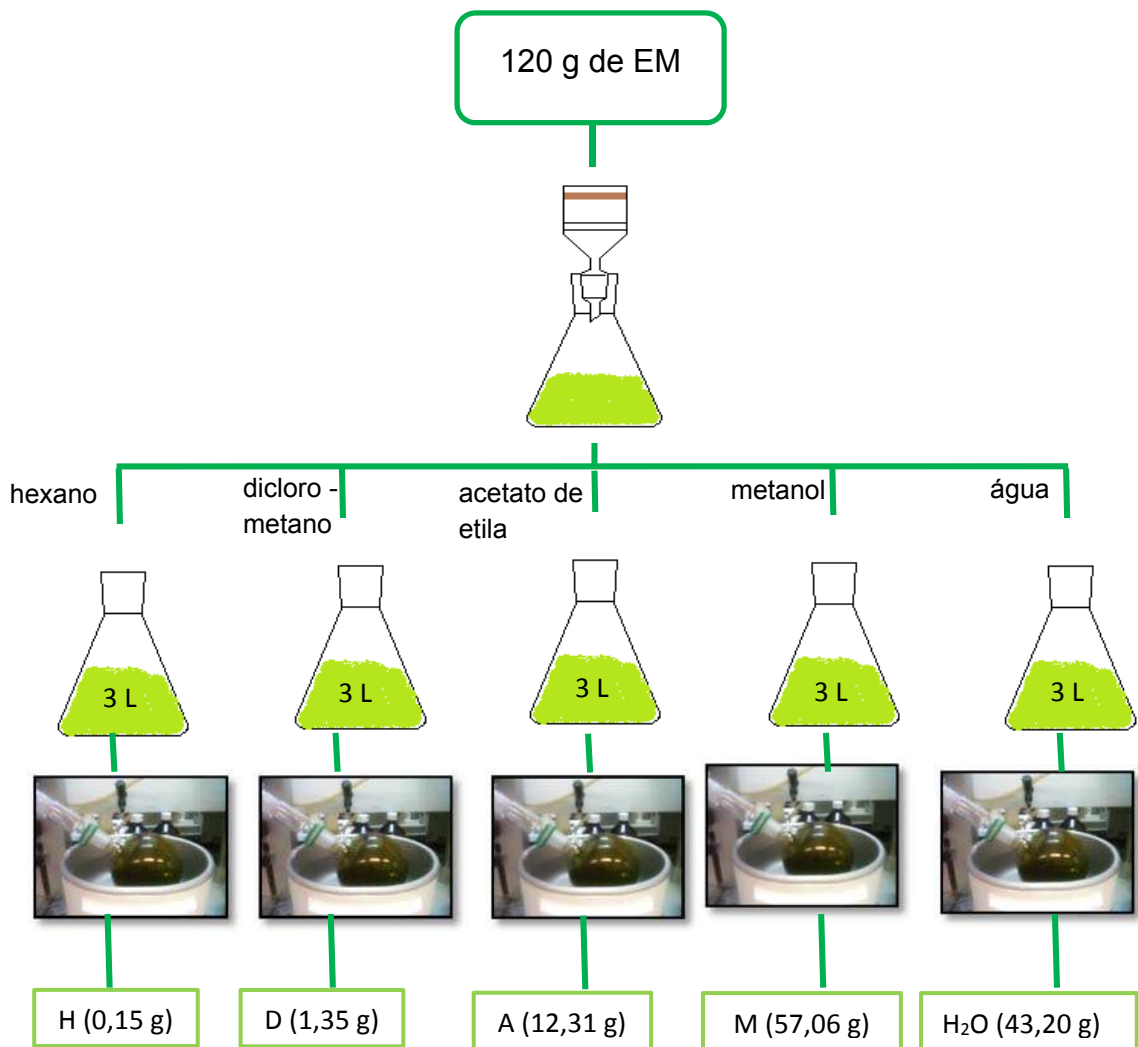
Foram coletados 13,7 Kg de parte aérea de *Mucuna pruriens*. que foram secados durante 10 h a 50 °C em estufa com ventilação forçada de ar quente, posteriormente foi moído e foram obtidos 2,7 Kg. Para a realização do extrato metanólico por maceração foram colocados 3 L de metanol por cada Kg de material vegetal seco e moído, e deixados durante 4 dias. Após esse período o material foi filtrado e o sólido vegetal foi extraído novamente com metanol por 4 dias. A solução metanólica foi separada e concentrada sob pressão reduzida obtendo-se, finalmente 319,8 g de extrato metanólico (EM) (Figura 3)



**Figura 3-** Esquema de obtenção do extrato metanólico de folhas e caule de *Mucuna pruriens*.

O extrato metanólico (EM) foi submetido à separação por coluna filtrante com solventes de diferentes polaridades. Foram feitas três colunas filtrantes em sílica gel com 40 g de amostra e 1 L de cada um dos solventes, para um total de 120 g de amostra totalizando 3 L de cada uma das frações. Os solventes foram removidos a pressão reduzida em evaporador rotatório para a obtenção das

frações em hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A), metanol (M) e água (H<sub>2</sub>O) (Figura 4).

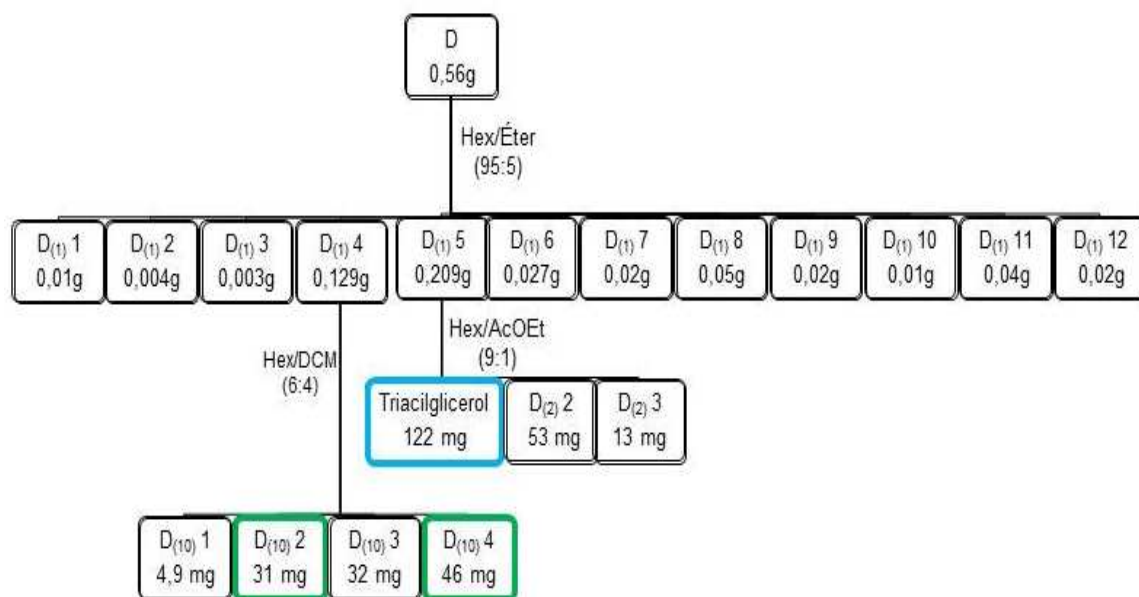


**Figura 4-** Esquema de obtenção das frações do extrato metanólico (EM) de folhas e caule de *M. pruriens*.

## 2.5 Obtenção de frações e compostos puros

### 2.5.1 Fração em diclorometano

A fração em diclorometano (D) foi parcialmente estudada após de fracionamento sucessivo por cromatografia em coluna de sílica gel, conforme apresentado na Figura 5. As frações destacadas em verde nesta figura estão compostas por misturas de ácidos graxos e o composto destacado em azul representa um triacilglicerol isolado.



**Figura 5-** Esquema simplificado do fracionamento da fração em diclorometano do extrato de folhas e caule de *Mucuna pruriens*.

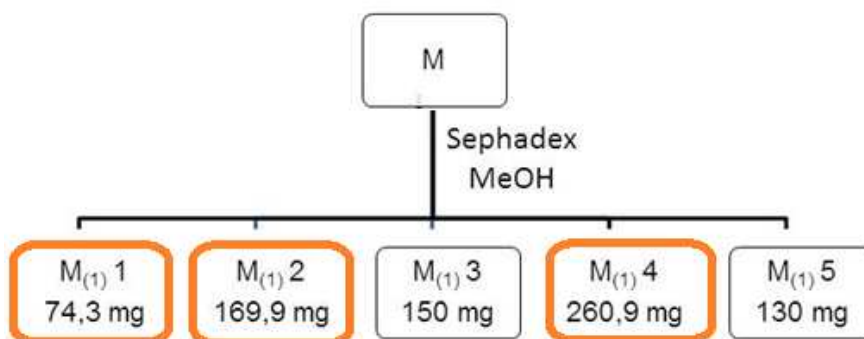
#### 2.5.1.1 Análise do triacilglicerol

O triacilglicerol foi analisado pela realização de derivatização por transesterificação para conhecer quais são os ácidos graxos que os compõem. A transesterificação foi realizada utilizando 3 mg da amostra, a qual foi solubilizada em 2 mL de hexano. Depois foram adicionados 0,2 mL de KOH em metanol 2 mol L<sup>-1</sup>, e agitação durante 10 minutos. Finalmente foram colocados 2 mL de solução

aquosa saturada de NaCl, e observou-se formação de duas fases. Ésteres metílicos de ácidos foram analisadas, após injeção de um 1  $\mu$ L da fase orgânica em cromatógrafo de gás acoplada a um espectrômetro de massa (Oliveros-Bastidas et al., 2013).

### 2.5.2 Fração de metanol

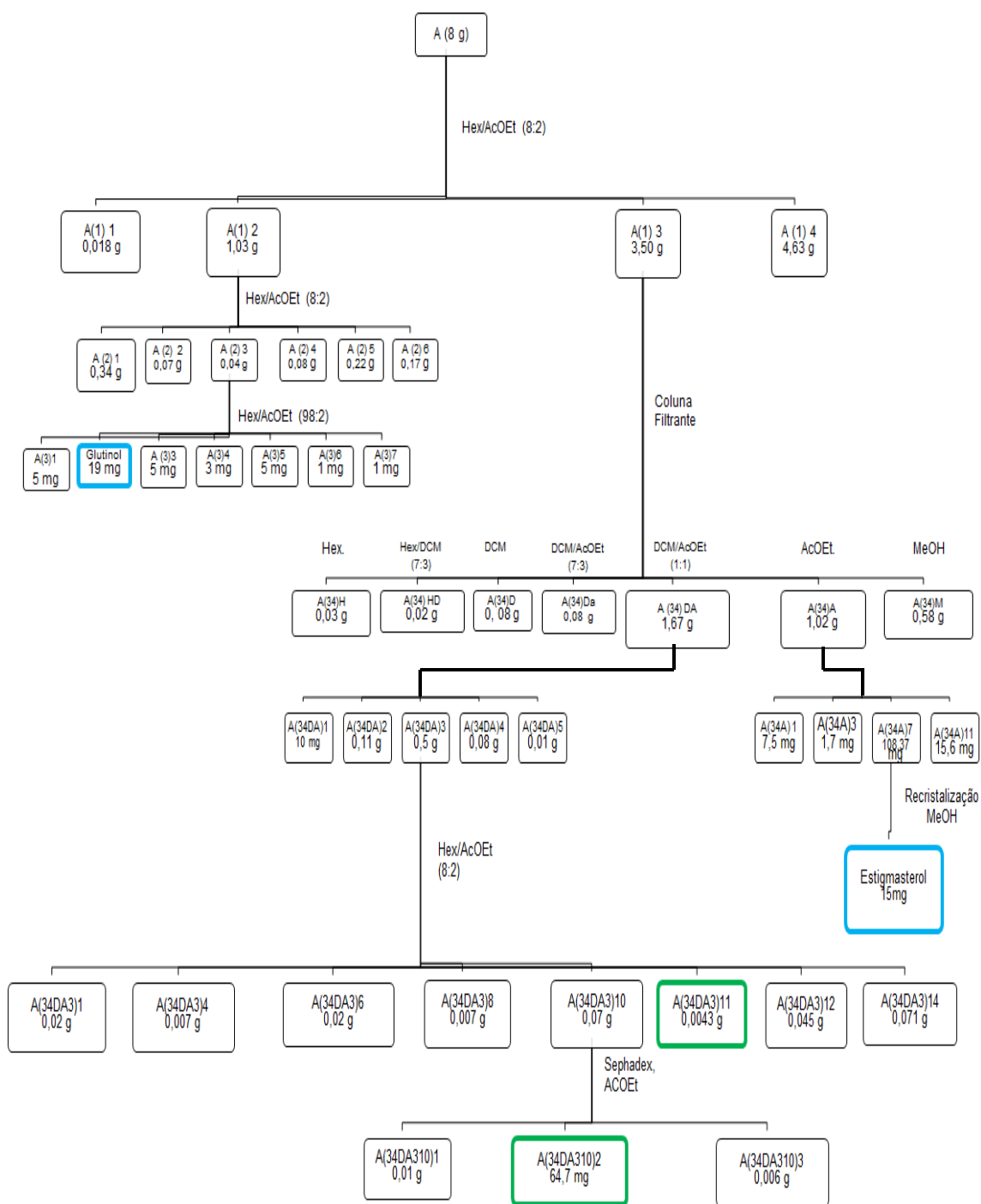
A fração de metanol foi submetida a fracionamento por coluna de sephadex com metanol como eluente, tendo uma separação por tamanho que permitiu a obtenção de 5 frações das quais as frações ressaltadas em cor laranja foram analisadas por LC-ESI-MS/MS (Figura 6).



**Figura 6-** Esquema simplificado do fracionamento da fração em metanol do extrato de folhas e caule de *Mucuna pruriens*.

### 2.5.3 Fração em acetato de etila

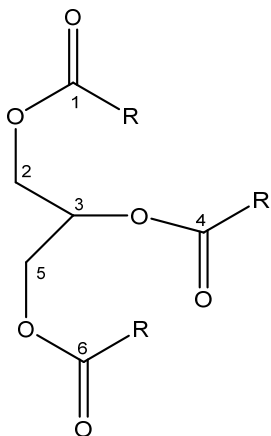
Inicialmente foi realizada coluna em via seca de celulosa a 8 g da fração em acetato de etila, após foi submetida a sucessivos fracionamentos em coluna utilizando diferentes fases estacionárias como sílica gel e sephadex, e foram utilizadas diferentes solventes como fase móvel. Deste processo de fracionamento foram obtidos dos compostos puros os quais aparecem destacados em azul e duas frações ( $A_{(34DA3)11}$  e  $A_{(34DA310)2}$ ) destacadas em verde (Figura 7); as quais possuem misturas de ácidos graxos.



**Figura 7-** Esquema simplificado do fracionamento da fração em acetato de etila do extrato de folhas e caule de *Mucuna pruriens*.

### 2.5.3 Dados físicos e experimentais das substâncias isoladas de *Mucuna pruriens*.

#### 2.5.3.1. Triacilglicerol



R= ácido palmítico, ácido linoleico e ácido linolênico.

**Óleo amarelo.**

**CCD:**  $R_f = 0,5$  (hexano/acetato de etila, 8:2 v/v).

**IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )**  $\bar{\nu}_{\text{max}}$ : 3445, 3010, 2925, 2853, 1745, 1636, 1462, 1163 e 721.

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (mult.,  $J/\text{Hz}$ ): 5,27 (m, H-3); 4,30 (dd,  $J = 11,9$  e  $J = 4,3$ , H-2); 4,15 (dd,  $J = 11,9$  e  $J = 5,9$ , H-5).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 173,3$  (C1); 173,2 (C4); 172,8 (C6); 62,1 (C3).

**Éster do ácido palmítico:**

**EM (IE),  $m/z$  (%):** 270 (7)  $[\text{M}]^+$ , 227 (12), 143 (15), 87 (70), 74 (92), 43 (94), 41 (100).

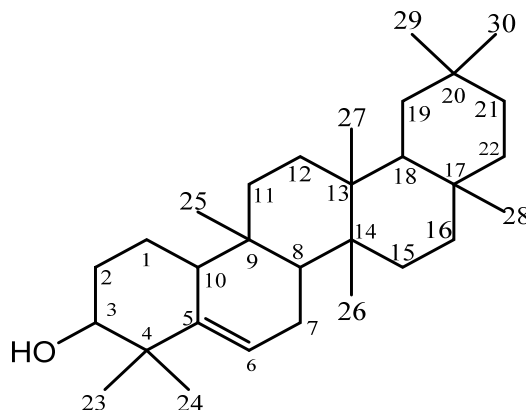
**Éster do ácido linoleico:**

**EM (IE),  $m/z$  (%):** 294 (6)  $[\text{M}]^+$ , 263 (7), 109 (22), 95 (55), 81 (75), 67 (100), 55 (73), 41 (97).

**Éster do ácido linolênico:**

**EM (IE),  $m/z$  (%):** 292 (2)  $[M]^+$ , 236 (3), 108 (25), 93 (45), 79 (89), 67 (13), 55 (15), 41 (100).

### 2.5.3.1. Glutinol



**Sólido branco.**

$T_f = 202\text{ }^\circ\text{C}$

**CCD:**  $R_f = 0,5$  (hexano/acetona, 85:15 v/v).

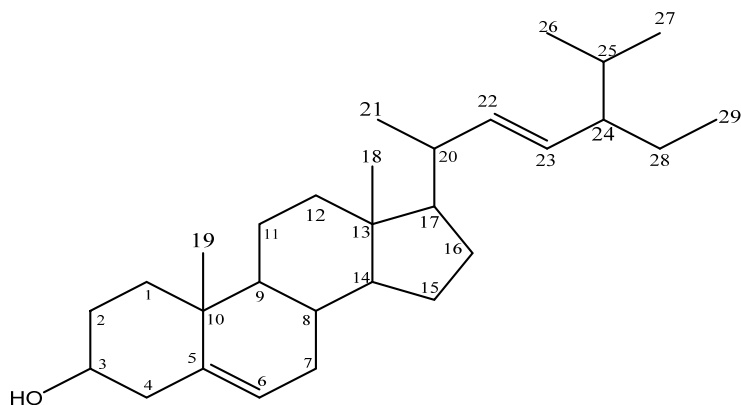
**IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\bar{\nu}_{\text{max}}$ :** 3446, 2949, 1636, 1382 e 1180.

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  (mult.,  $J/\text{Hz}$ ): 5,63 (d,  $J = 6,3$ , 1H, H-6); 3,47 (t,  $J = 2,4$ , 1H, H-3); 1,17 (s, 3H, H-25); 1,14 (s, 3H, H-24); 1,10 (s, 3H, H-27); 1,05 (s, 3H, H-23); 1,01 (s, 3H, H-28); 0,99 (s, 3H, H-26); 0,95 (s, 3H, H-29); 0,85 (s, 3H, H-30).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  = 141,6 (C-5); 122,0 (C-6); 76,3 (C-3); 49,7 (C-8); 47,4 (C-10); 43,0 (C-18); 40,8 (C-13); 39,2 (C-4); 38,9 (C-22); 37,8 (C-14); 36,0 (C-16); 35,0 (C-19); 34,8 (C-9); 34,6 (C-11); 34,5 (C-29); 33,1 (C-21); 32,4 (C-28); 32,0 (C-30); 32,0 (C-15); 30,3 (C-12); 30,1 (C-17); 28,9 (C-23); 28,2 (C-20); 27,8 (C-2); 25,4 (C-24); 23,6 (C-7); 19,6 (C-26); 18,4 (C-27); 18,2 (C-1); 16,2 (C-25).

**EM (IE),  $m/z$  (%):** 426(1)  $[M]^+$ , 274 (32), 259 (49), 205 (10), 134 (31), 119 (45), 69 (83), 55 (92) e 41 (100).

### 2.5.3.1. Estigmasterol



**Sólido branco.**

$T_f = 166,5\text{ }^\circ\text{C}$

**CCD:**  $R_f = 0,3$  (hexano/acetona, 85:15 v/v).

**IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ )**  $\bar{\nu}_{\text{max}}$ : 3434, 3026, 2962, 2935, 2863, 1456 e 1381.

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (mult.,  $J/\text{Hz}$ ): 5,35 (d,  $J = 4,1$ , 1H, H-6); 5,15 (dd,  $J_{22,23} = 15,2$  e  $J_{22,20} = 8,2$ , 1H, H-23); 5,03 (dd,  $J_{22,23} = 15,2$  e  $J_{23,24} = 8,5$ , 1H, H-22); 3,53 (m, H-3).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta = 140,7$  (C-5); 138,3 (C-22); 129,2 (C-23); 121,7 (C-6); 71,8 (C-3); 56,8 (C-13); 56,7 (C-14); 56,0 (C-17); 51,2 (C-24); 50,1 (C-9); 42,3 (C-4); 40,5 (C-20); 39,7 (C-12); 37,2 (C-1); 36,5 (C-10); 31,9 (C-8); 31,6 (C-2); 31,4 (C-7); 29,1 (C-25); 28,9 (C-16); 25,4 (C-28); 24,3 (C-15); 21,4 (C-26); 21,2 (C-21); 21,0 (C-11); 19,4 (C-19); 18,9 (C-27); 12,2 (C-18); e 12,0 (C-29).

**EM (IE),  $m/z$  (%):** 412(56)  $[\text{M}]^+$ , 300 (31), 271(48), 255 (48), 213 (26), 159 (43), 95 (74), 81 (90), 55 (100) e 43 (92).

## 2.6 Avaliação da atividade nematicida

Para a realização desta atividade, ovos do nematoide das galhas, caracterizados por meio de corte perineal, foram obtidos a partir de galhas de raízes de tomateiro mantidos em casa de vegetação.

Para a extração dos ovos, as raízes foram lavadas e picadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e, em seguida, transferidas para o liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5%. Foram trituradas por 20 segundos na menor velocidade. Os juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) foram obtidos a partir de câmara de eclosão feita em funil de Baermann. Os  $J_2$  obtidos após 24 h foram descartados e coletados aqueles produzidos após 48 h. A suspensão de  $J_2$  foi calibrada em câmara de Peters para 1000  $J_2$ /mL.

O efeito dos extratos, frações e compostos puros de *M. pruriens* na mortalidade dos  $J_2$  de *M. javanica* foi avaliado colocando-se 100  $\mu$ L de cada dose em concentração de 100 ppm em cada célula da placa Elisa (capacidade de 300  $\mu$ L/célula) e 100  $\mu$ L da suspensão de  $J_2$  (concentração de 150  $J_2$ / $\mu$ L). Após 48 h adicionou-se a cada célula da placa Elisa uma a duas gotas de NaOH 1 mol/L e imediatamente foi realizada a contagem dos nematoides, caracterizados como mortos aqueles que apresentavam o corpo reto e imóveis, e aqueles com o corpo retorcido como vivos (Ribeiro et al., 2012).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

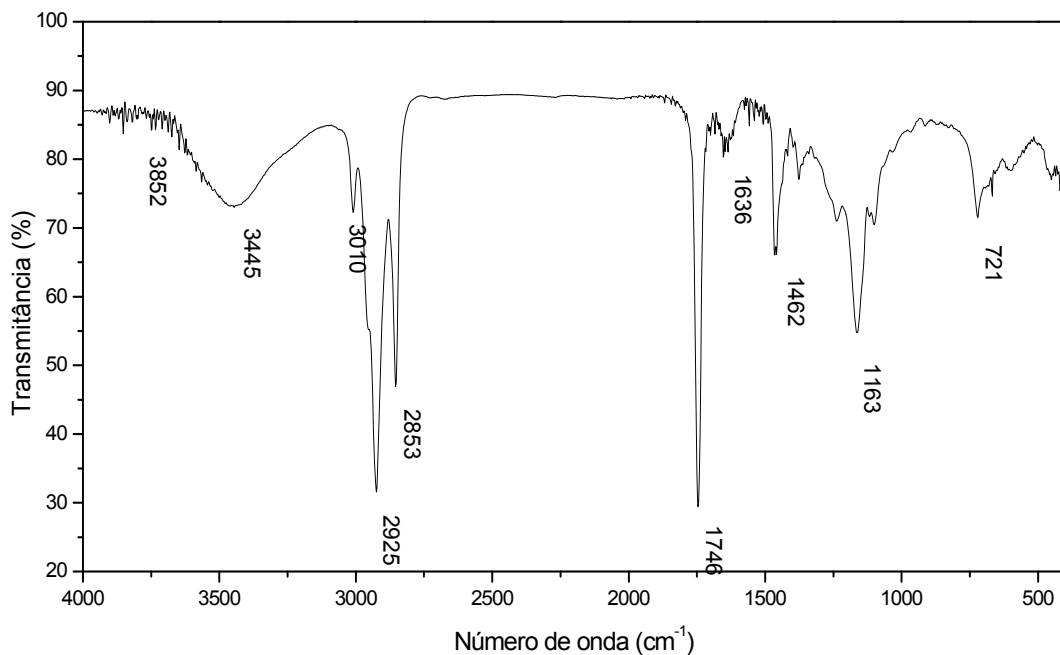
Após do fracionamento do extrato das folhas e caule de *M. pruriens* foi possível a obtenção de substâncias puras como glutinol (19 mg), estigmasterol (15 mg) e um triacilglicerol (122 mg). Além disso, foi possível obter as frações  $A_{(34DA3)}11$  (43 mg),  $A_{(34DA310)}2$  (64,7 mg),  $D_{(10)}2$  (31 mg),  $D_{(10)}4$  (46),  $M_{(1)}1$  (74,3 mg),  $M_{(1)}2$  (169,9 mg) e  $M_{(1)}4$  (260,9 mg), as quais foram caracterizadas e identificadas por métodos espectroscópicos (IV, EM, LC-ESI-MS/MS, RMN de  $^1H$ , RMN de  $^{13}C$ ), e temperatura de fusão.

A identificação e caracterização tanto dos compostos como das frações será descrita individualmente, a seguir.

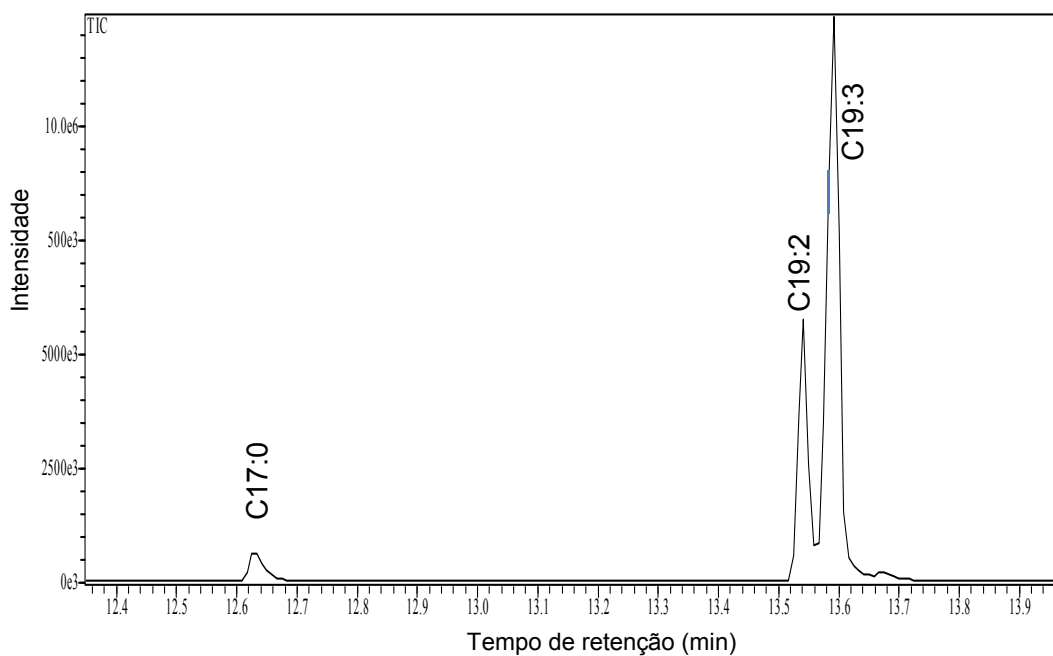
#### 3.1 Elucidação estrutural do triacilglicerol

Observa-se no espectro de IV do composto (Figura 8) uma banda na região de  $3445\text{ cm}^{-1}$ , produzida pela vibração de estiramento do OH. Além disso, as bandas em  $3010\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$ , são devidas a vibrações de estiramento de  $C_{sp^2}-H$  e  $C_{sp^3}-H$ , respectivamente. A banda encontrada na região de  $1746\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento  $C=O$  característico de ésteres. Já a banda em  $1636\text{ cm}^{-1}$ , junto á banda larga que aparece em  $3445\text{ cm}^{-1}$  são indicativas da presença de água na amostra proveniente do KBr, utilizado para a realização da análise. A banda em  $1462\text{ cm}^{-1}$  é referente às vibrações de deformação angular de  $CH_2$ . Por último, a banda em  $1163\text{ cm}^{-1}$  do estiramento C-O e em  $721\text{ cm}^{-1}$  uma banda característica de cadeia carbonada longa  $(CH_2)_n$  com  $n \geq 4$  (Barbosa, 2007).

Este espectro de IV é característico de ésteres o que indica tratar-se de um triacilglicerol, fato que levou a realização da derivatização da amostra por transesterificação para ser analisada por CG. No cromatograma de CG obtido deste composto nota-se a presença de três picos, os quais correspondem aos ésteres metílicos de ácidos graxos (Figura 9).

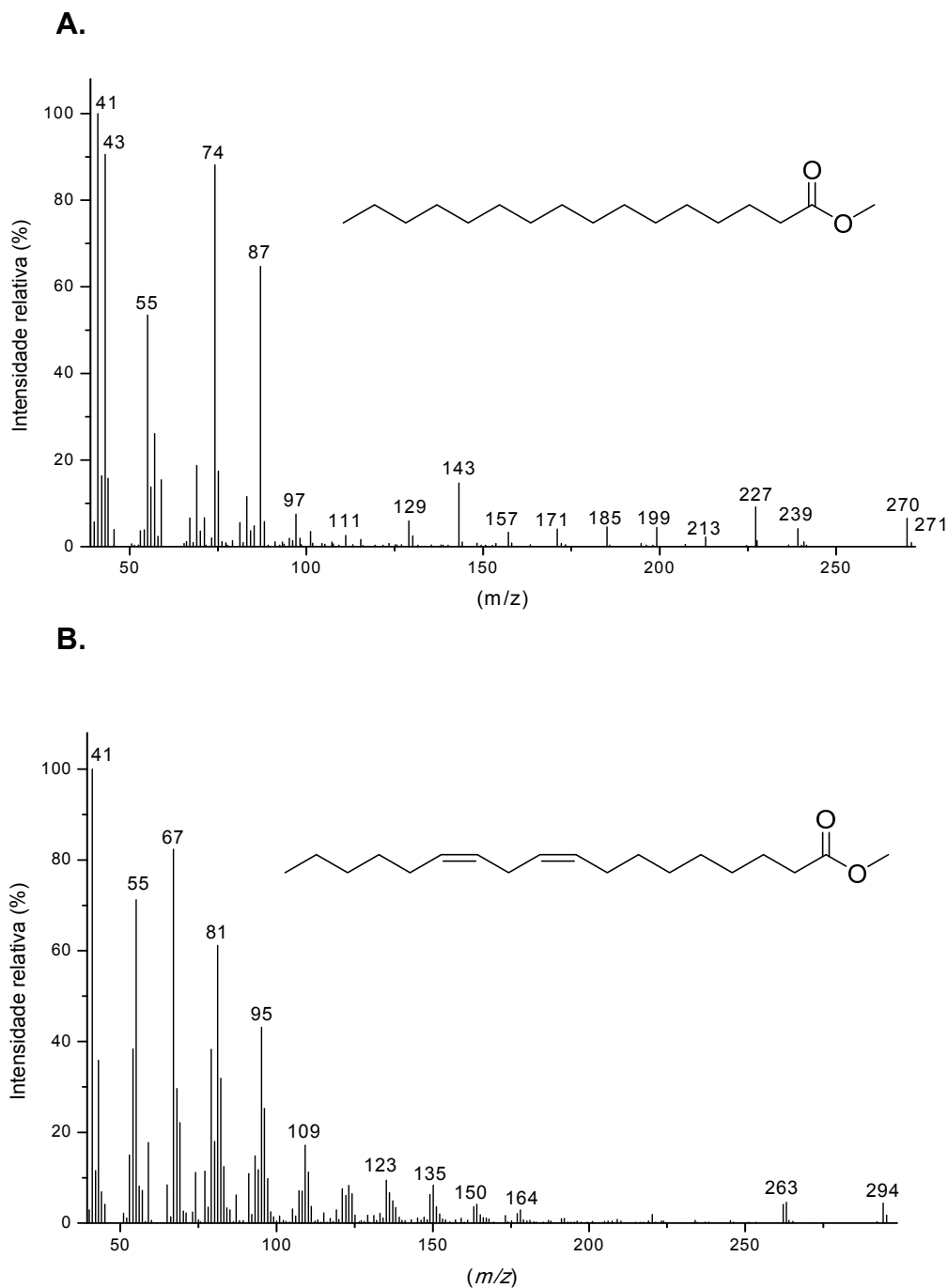


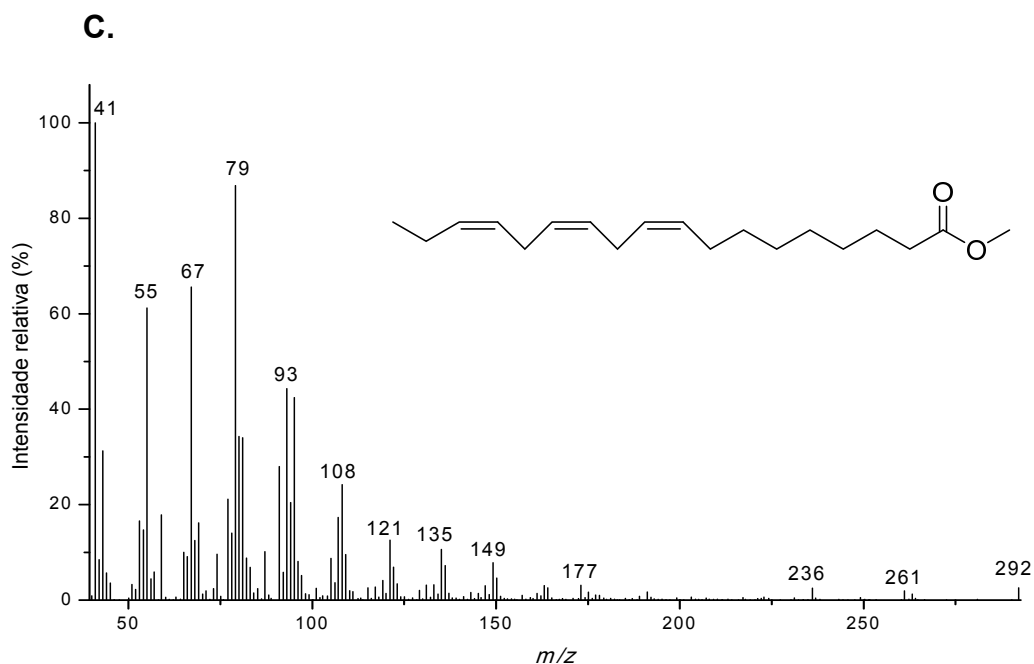
**Figura 8** – Espectro no infravermelho (KBr) do triacilglicerol obtido da fração em diclorometano do extrato metanólico da parte aérea de *M. pruriens*.



**Figura 9**- Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol obtido da fração em diclorometano do extrato metanólico da parte aérea de *M. pruriens*.

Além do cromatograma do triacilglicerol em que foi verificada a presença de três ésteres metílicos de ácidos graxos, correspondentes aos grupos R ligados no triacilglicerol, foram obtidos os espectros de massas destes compostos, sendo identificados como os ésteres metílicos do ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) (Figura 10).





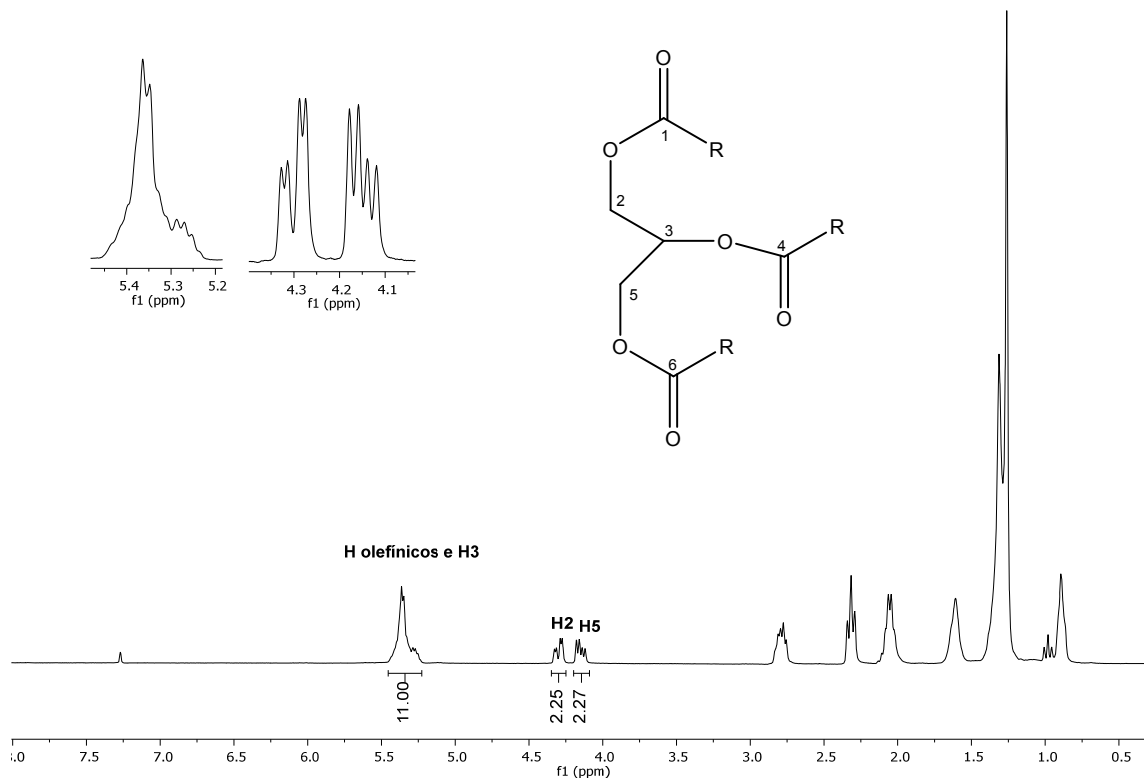
**Figura 10** – Espectros de massas dos ésteres de ácidos graxos presentes ligados no triacilglicerol: **A.** palmitato de metilo, **B.** linoleato de metilo, **C.** linolenato de metilo.

No espectro de RMN de hidrogênio (Figura 11) nota-se um multipeto em  $\delta = 5,27$  (H-3) devido a um hidrogênio com um ambiente químico altamente retirador de elétrons o qual faz com que ele esteja mais desblindado. Isto possivelmente pode ser devido ao fato do carbono que possui esse hidrogênio estar ligado a um oxigênio, e encontrar-se vizinho de outros átomos que contribuem para aumentar seu deslocamento no espectro. Também se observa multipeto na região de hidrogênios olefínicos em  $\delta = 5,36$  e dois duplos dupletos em  $\delta = 4,30$  (H-2) e  $\delta = 4,15$  (H-5), os quais se encontram na região de hidrogênios metilênicos dos carbonos ligados a oxigênio.

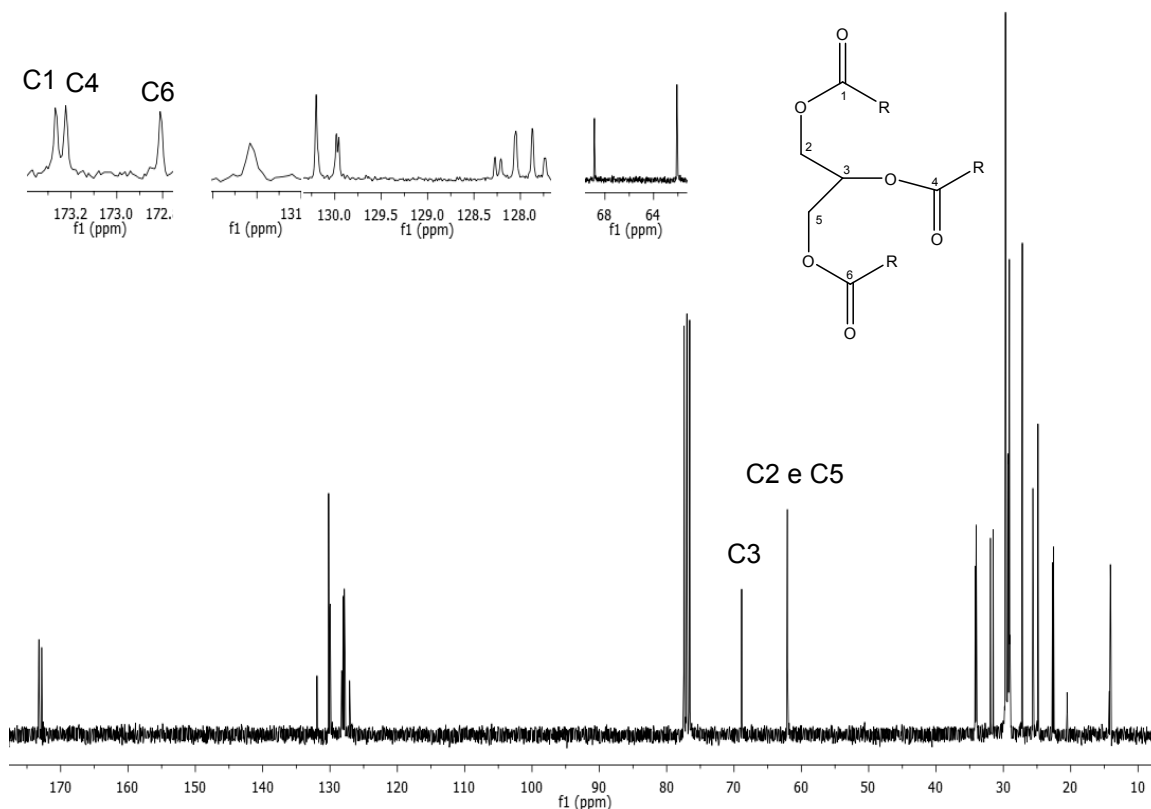
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) pode-se evidenciar que o composto estudado é um triacilglicerol, devido os sinais característicos observados. Os sinais em  $\delta = 173,3$ ,  $173,2$ , e  $172,8$  estão relacionados aos carbonos de três cabonilas presentes no triacilglicerol. Além disso, foram observados 10 sinais na região de carbono olefínico em  $\delta = 127,1$ ,  $127,7$ ,  $127,9$ ,  $128,0$ ,  $128,2$ ,  $128,3$ ,  $129,9$ ,  $129,9$ ,  $130,2$ ,  $131,9$ , que são devidos a duplas ligações dos ácidos graxos ligados ao triacilglicerol, indicando que o composto possui 3 grupos R com 5 duplas ligações

em total. Também se notam dois sinais na região de carbonos ligados a oxigênio, um sinal em  $\delta = 62,1$  que corresponde ao carbono metínico ligado a oxigênio o qual se encontra mais desblindado em comparação com os outros carbonos ligados a oxigênio devido a uma vizinhança altamente retiradora de elétrons. Outro sinal observado em  $\delta = 68,9$  corresponde aos carbonos de metilênicos ligados a oxigênio.

O triacilglicerol, possui como grupos R três ácidos graxos, dos quais dois apresentam insaturações, sendo que a ordem em que estes encontram-se distribuídos no composto não foi determinada.



**Figura 11** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do triacilglicerol.



**Figura 12** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do Triacilglicerol.

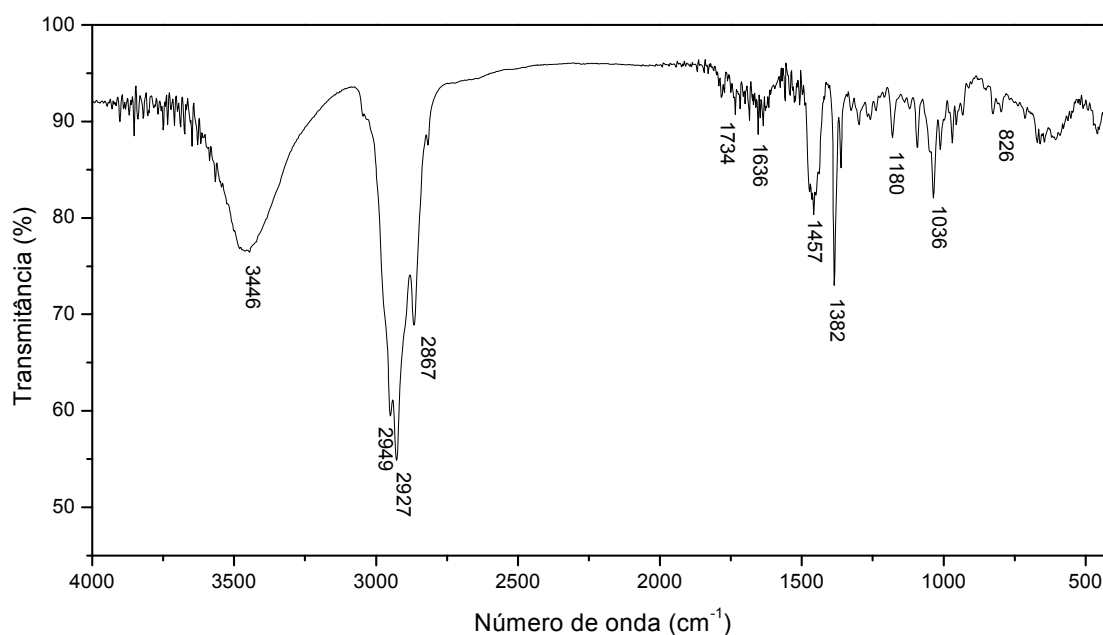
Os triacilgliceróis são compostos naturais, sintetizados por esterificação de glicerol com ácidos graxos sob catálise enzimática. No organismo humano, servem como uma fonte de energia armazenada nos tecidos adiposos, camada de proteção térmica e mecânica circundante em órgãos importantes, fonte de ácidos graxos essenciais (linoleico e linolénico), vitaminas solúveis em gordura e de outros compostos não polares.

Eles formam uma parte importante da dieta humana e seus desequilíbrios podem levar a várias doenças, como dislipidemia ou obesidade. As principais fontes de triacilgliceróis na dieta humana são plantas oleaginosas e óleos especialmente preparados a partir delas (Lísa e Holcapek, 2008).

O resultado obtido após a elucidação estrutural estão em concordância com o relatado na literatura para *M. pruriens*, a qual é uma planta rica em ácidos graxos, esteróis e triterpenos.

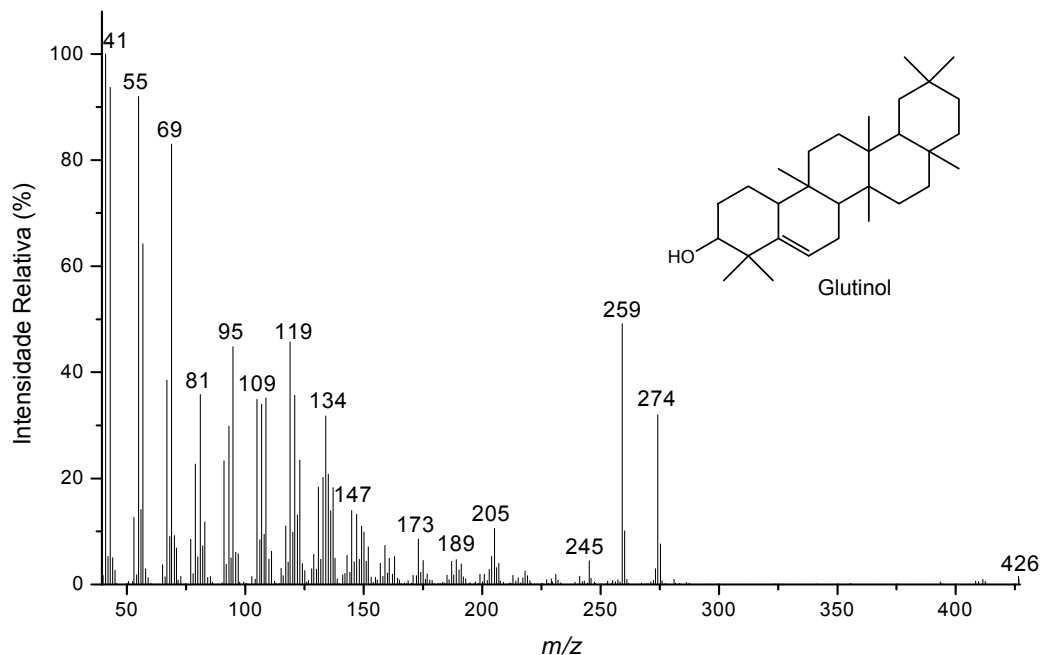
### 3.2 Elucidação estrutural do glutinol

O composto foi obtido como sólido branco com temperatura de fusão de 202 °C. Observa-se no espectro IV (Figura 13), uma banda na região de 3446 cm<sup>-1</sup>, referente a estiramento do OH. Notam-se outras bandas em 2949 cm<sup>-1</sup> e 2867 cm<sup>-1</sup>, devido a vibrações Csp<sup>3</sup>-H. A banda encontrada em 1636 cm<sup>-1</sup>, associada à banda em 3446 cm<sup>-1</sup>, indica a presença de água no KBr utilizado para a realização do espectro. As bandas em 1382 cm<sup>-1</sup> e 1180 cm<sup>-1</sup> são referente às vibrações de estiramento C-O.

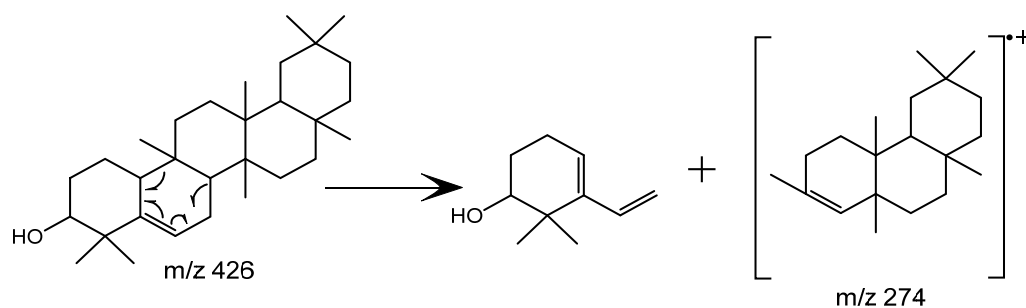


**Figura 13** – Espectro no infravermelho (KBr) do glutinol.

No espectro de massas (Figura 14) observou-se que o composto possui pico de íon molecular de 426 [M<sup>+</sup>], e um padrão de fragmentação característico de triterpenos, com picos em ( $m/z = 411, 274, 259, e 205$ ). O fragmento em  $m/z = 274$  (Figura 15) acontece por meio de uma fragmentação *retro*-Diels-Alder. Este fragmento é importante na elucidação estrutural, pois indica o local da dupla na molécula. O composto foi identificado como glutinol.



**Figura 14** - Espectro de massas do glutinol.

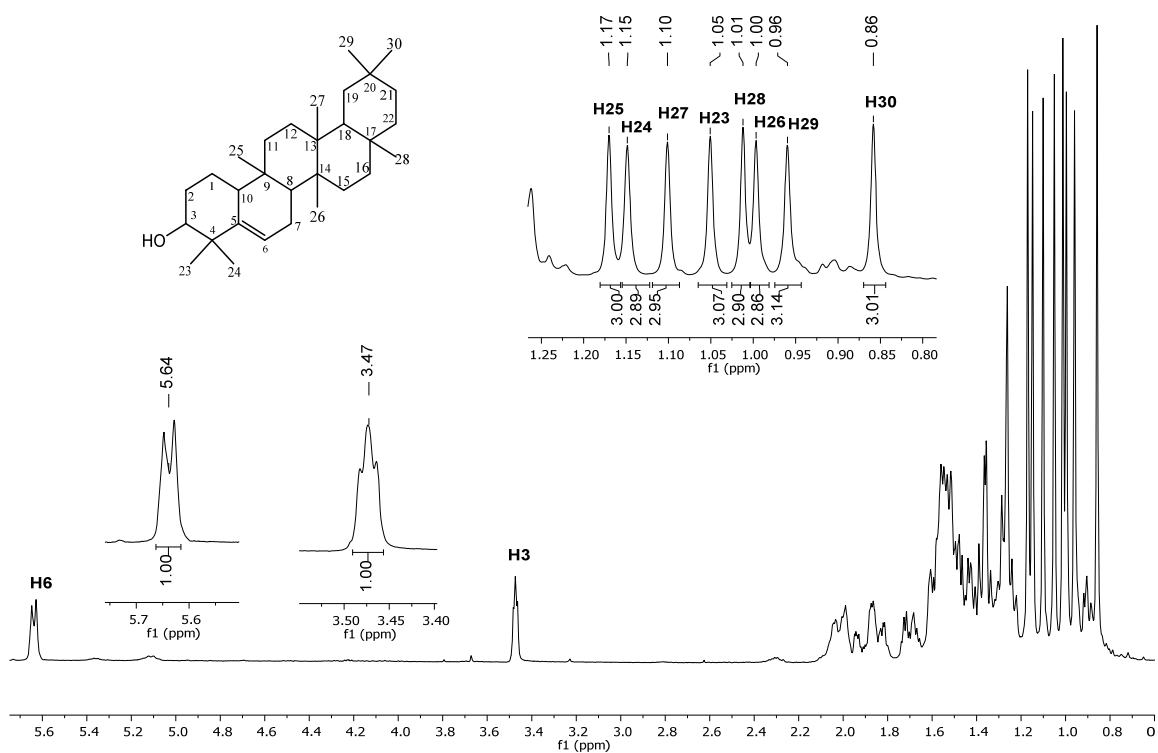


**Figura 15** – Fragmento em  $m/z = 274$  do glutinol.

Para verificar a estrutura do composto foram realizados espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

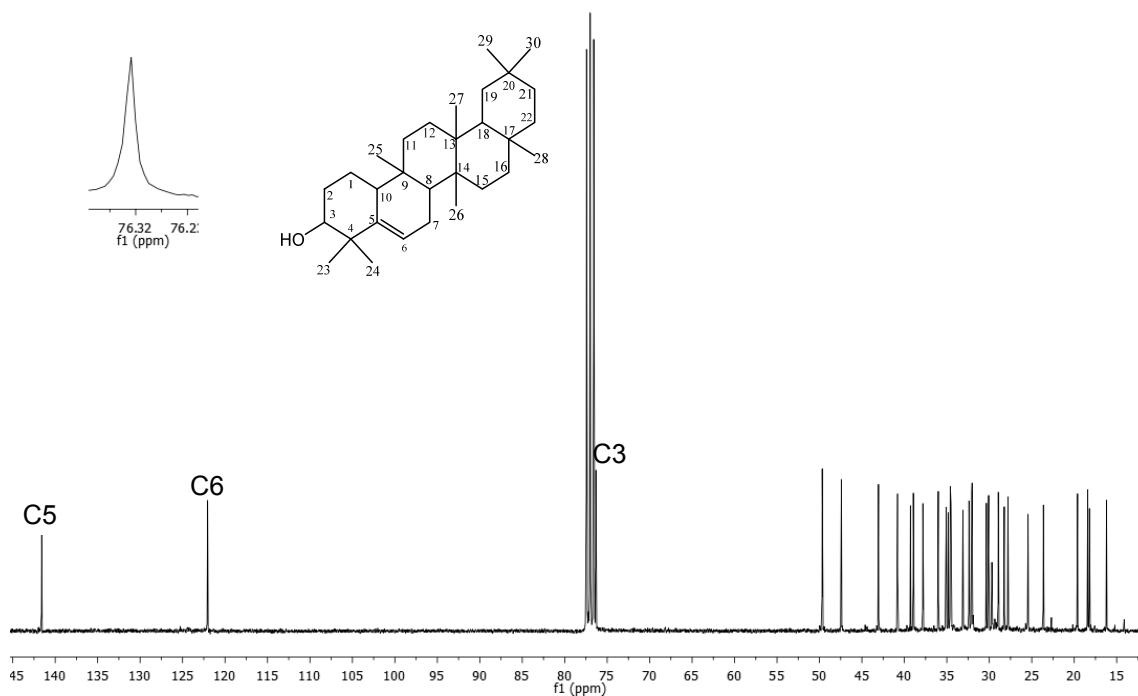
No espectro de RMN de hidrogênio observa-se um duplete em  $\delta = 5,63$  (d,  $J = 6,3$  Hz, 1H), correspondente a H6, um hidrogênio ligado ao carbono olefínico C-6, um tripleto em  $\delta = 3,47$  (t,  $J = 2,4$  Hz, 1H), relativo ao hidrogênio ligado ao carbono C-3. Finalmente observam-se sinais de simpletos referentes aos hidrogênios

metílicos dos carbonos (25, 24, 27, 23, 28, 26, 29, 30, respectivamente), 1,17, 1,14, 1,10, 1,05, 1,01, 0,99, 0,95, 0,85 (Figura 16). As atribuições foram feitas em comparação com os dados obtidos na literatura (Lee et al., 2009).



**Figura 16** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do glutinol.

No RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 17) nota-se um sinal em  $\delta = 76,3$  devido ao carbono 3 ligado ao oxigênio. Além disso, são observados dois sinais em  $\delta = 141,6$  e  $\delta = 122,0$  que correspondem aos carbonos C-5 e C-6 com maior deslocamento causado pela ligação dupla. As atribuições tanto dos hidrogênios como dos carbonos foi feita em comparação com dados da literatura para corroborar a identidade do Glutinol, (Tabelas 1 e 2).



**Figura 17** – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do glutinol.

**Tabela 1:** Comparação dos dados obtidos no RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para glutinol com os relatados na literatura (Lee et al., 2009).

H	Glutinol $\delta^*_{Ex}$ (m, J/Hz)	Glutinol $\delta^*_L$ (m, J/Hz)
6	5,63 (d, 6,3)	5,61 (d, 6,3)
3	3,47 (t, 2,4)	3,44 (t, 2,8)
25	1,17 (s)	1,14 (s)
24	1,14 (s)	1,12 (s)
27	1,10 (s)	1,07 (s)
23	1,05 (s)	1,02 (s)
28	1,01 (s)	0,98 (s)
26	0,99 (s)	0,97 (s)
29	0,95 (s)	0,93 (s)
30	0,85 (s)	0,83 (s)

\*Ex: experimental, \*L: literatura.

**Tabela 2:** Comparação dos dados obtidos no RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para glutinol com os relatados na literatura (Miranda et al., 2012).

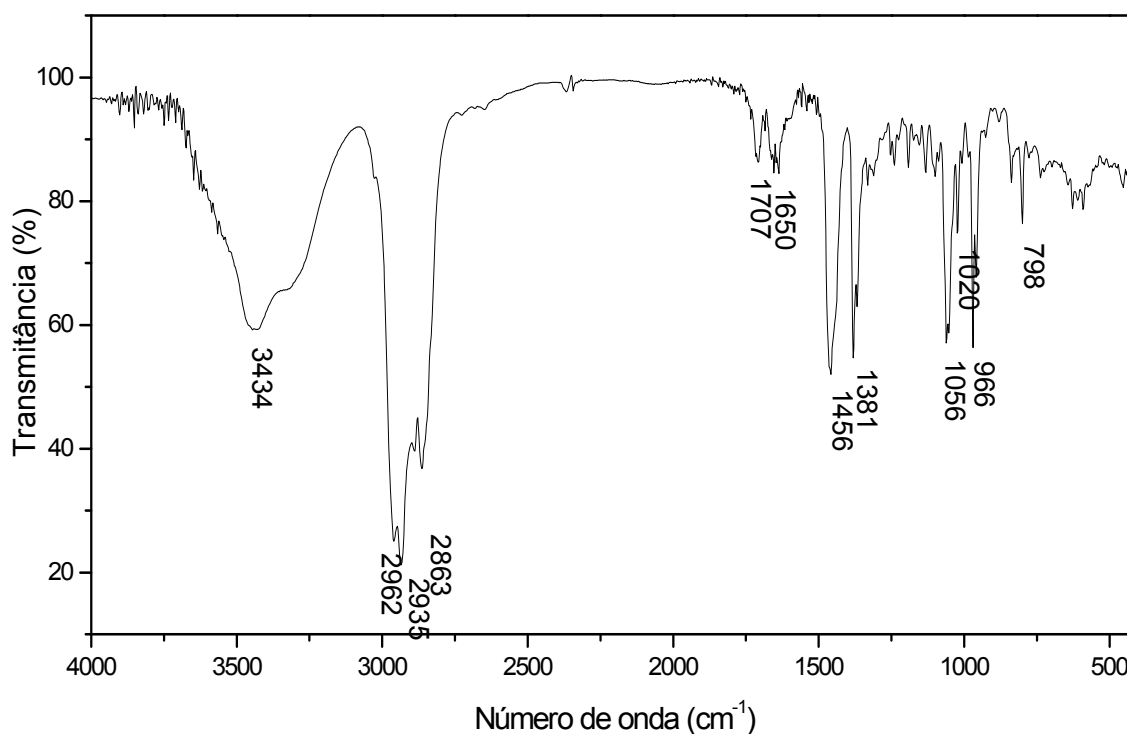
C	$\delta^*_{\text{Ex}}$ (ppm)	$\delta^*_{\text{L}}$ (ppm)	C	$\delta^*_{\text{Ex}}$ (ppm)	$\delta^*_{\text{L}}$ (ppm)
1	18,2	18,2	16	36,0	36,0
2	27,8	27,8	17	30,1	30,0
3	76,3	76,3	18	43,0	43,0
4	39,3	39,2	19	35,0	35,0
5	141,6	141,6	20	28,2	28,2
6	122,0	122,0	21	33,1	33,1
7	23,6	23,6	22	38,9	38,9
8	49,7	49,6	23	28,9	28,9
9	34,8	34,8	24	25,4	25,4
10	47,4	47,4	25	16,2	16,1
11	34,6	34,5	26	19,6	19,6
12	30,3	30,3	27	18,4	18,4
13	40,8	40,8	28	32,9	32,3
14	37,8	37,8	29	34,5	34,4
15	32,0	32,0	30	32,1	32,1

\*Ex: experimental, \*L: literatura.

O Glutinol pertence á classe dos triterpenos pentacíclicos. Os triterpenos são um dos grupos de terpenos mais estruturalmente diversificados. Terpenos constituem uma ampla classe de produtos naturais, que possuem muitas funções no reino vegetal e na saúde humana. Esta classe de substâncias faz parte da defesa de muitas espécies de plantas, animais e microrganismos contra predadores, patógenos e competidores, e estão envolvidos na transmissão de mensagens sobre a presença de alimento e organismos nocivos. Os triterpenos pentacíclicos são de grande interesse devido às diversas atividades biológicas apresentadas, servindo como candidatos ou protótipos de novos medicamentos (Silva et al., 2014). Este composto ainda não tem sido relatado na literatura para *Mucuna pruriens*.

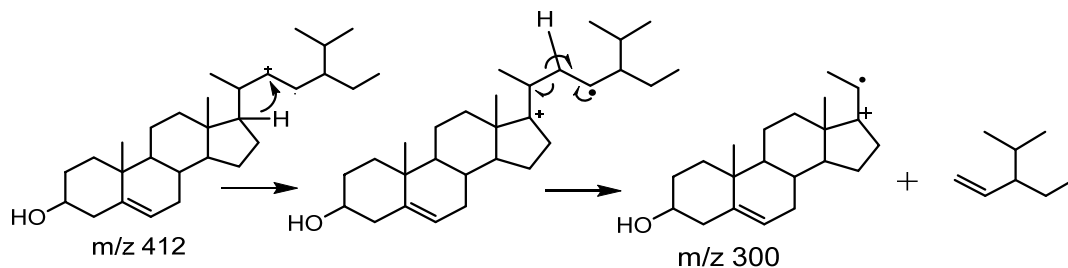
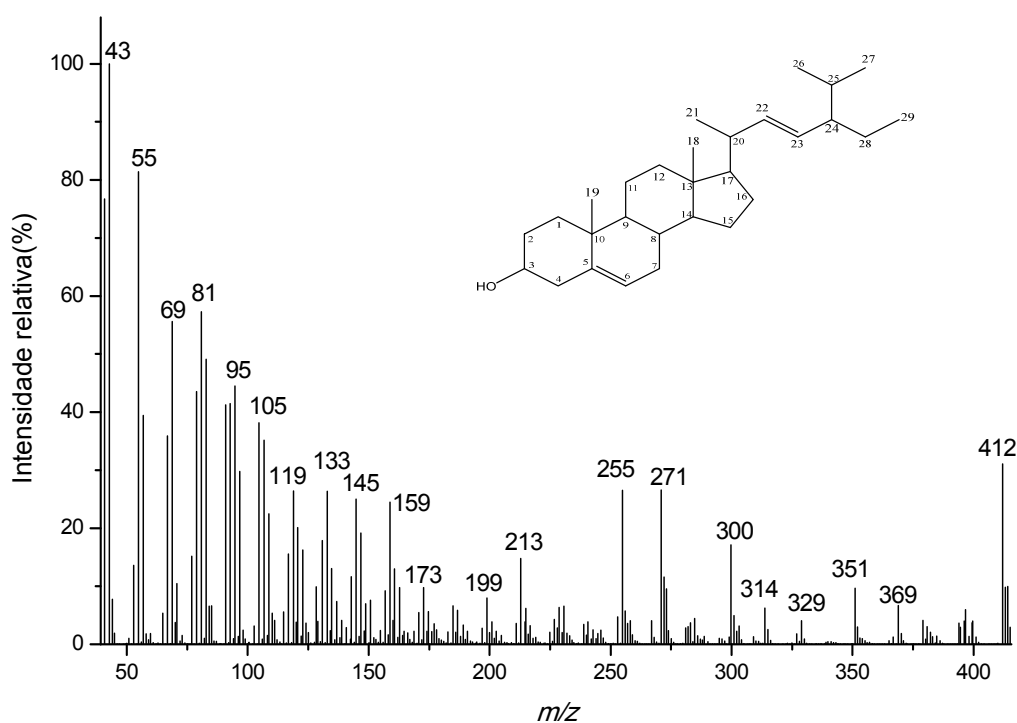
### 3.3 Elucidação estrutural do estigmasterol

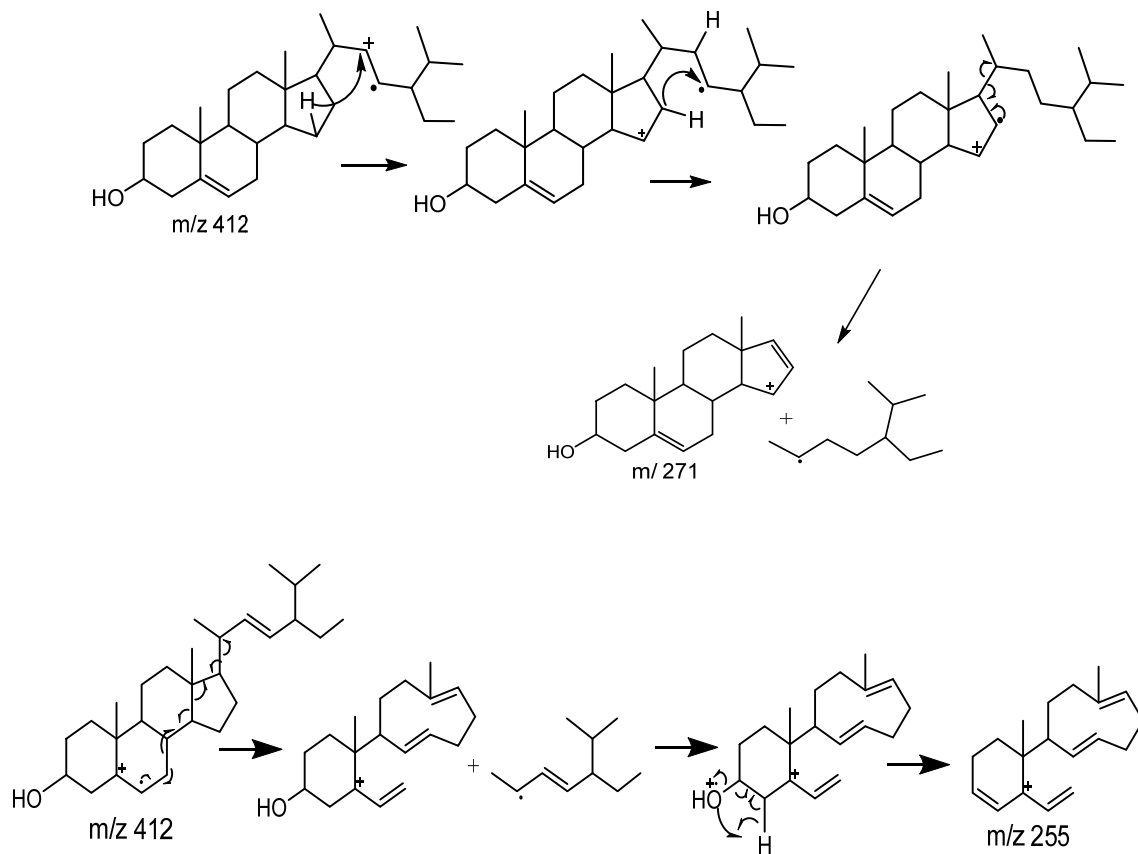
O composto obtido foi um sólido branco com temperatura de fusão de 166,5°C. Observa-se no espectro IV do composto (Figura 18) uma banda na região de 3434  $\text{cm}^{-1}$ , que pertence ao OH. Além disso, nota-se bandas em 3026  $\text{cm}^{-1}$ , 2962  $\text{cm}^{-1}$ , 2935  $\text{cm}^{-1}$  e 2863  $\text{cm}^{-1}$ , as quais são devidas a vibrações de estiramento de  $\text{C}_{\text{sp}2}$  -H e  $\text{C}_{\text{sp}3}$  -H respectivamente. Também se observam bandas em 1456  $\text{cm}^{-1}$  e 1381  $\text{cm}^{-1}$ , que são referentes á deformação angular de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  e, finalmente, verifica-se uma banda em 1056 a qual é característica de estiramento C-O.



**Figura 18** – Espectro no infravermelho (KBr) do estigmasterol.

Para o espectro de massas do composto verifica-se pico de íon molecular de 412 [M<sup>+</sup>], e fragmentos em ( $m/z = 300, 271, \text{ e } 255$ ), que são característicos de esteroides com núcleo  $\Delta^5$ -3- hidroxioandrosteno e cadeia lateral insaturada no carbono 22 (Martínez, 2002). No processo de identificação foram obtidos dois compostos com o mesmo peso molecular: o estigmasterol e o ergosterol. Porém graças ao padrão exibido pelos fragmentos o composto foi identificado como estigmasterol. O ergosterol não possui insaturação na cadeia lateral e, além disso, difere em o seu núcleo fato pelo qual não apresenta os fragmentos em  $m/z = 300$  e  $255$  (Figura 19).

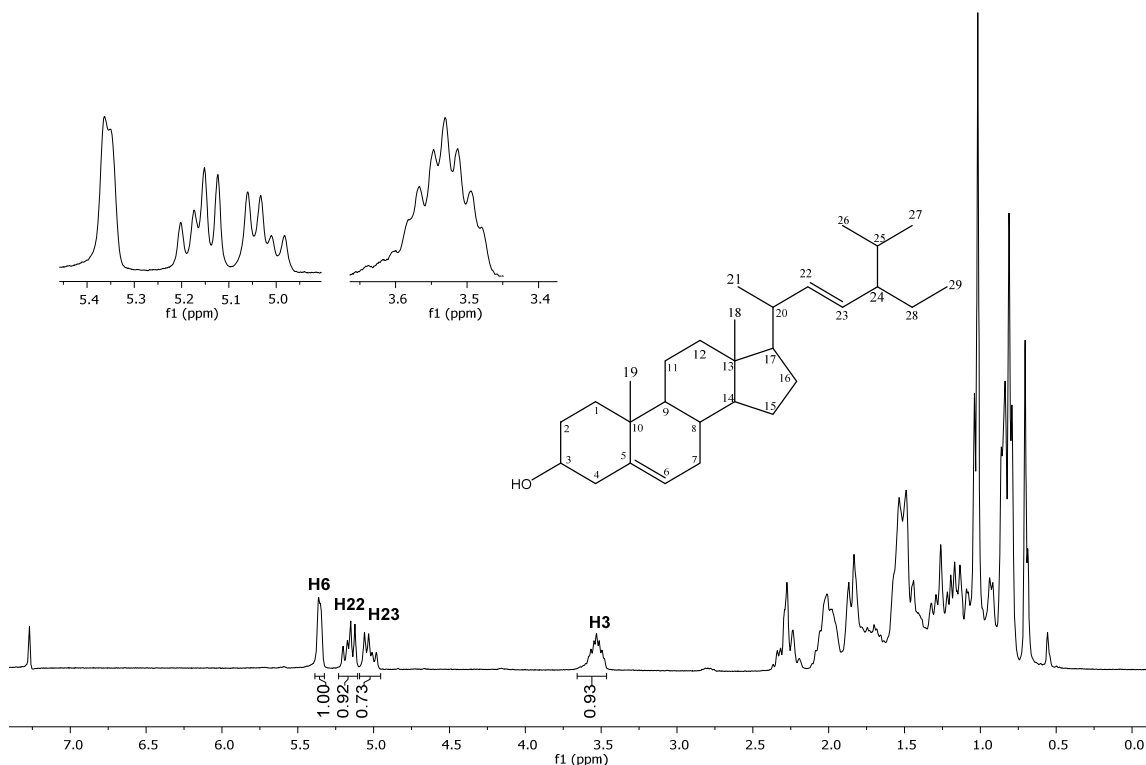




**Figura 19** – Espectro de massas e algumas fragmentações do estigmasterol.

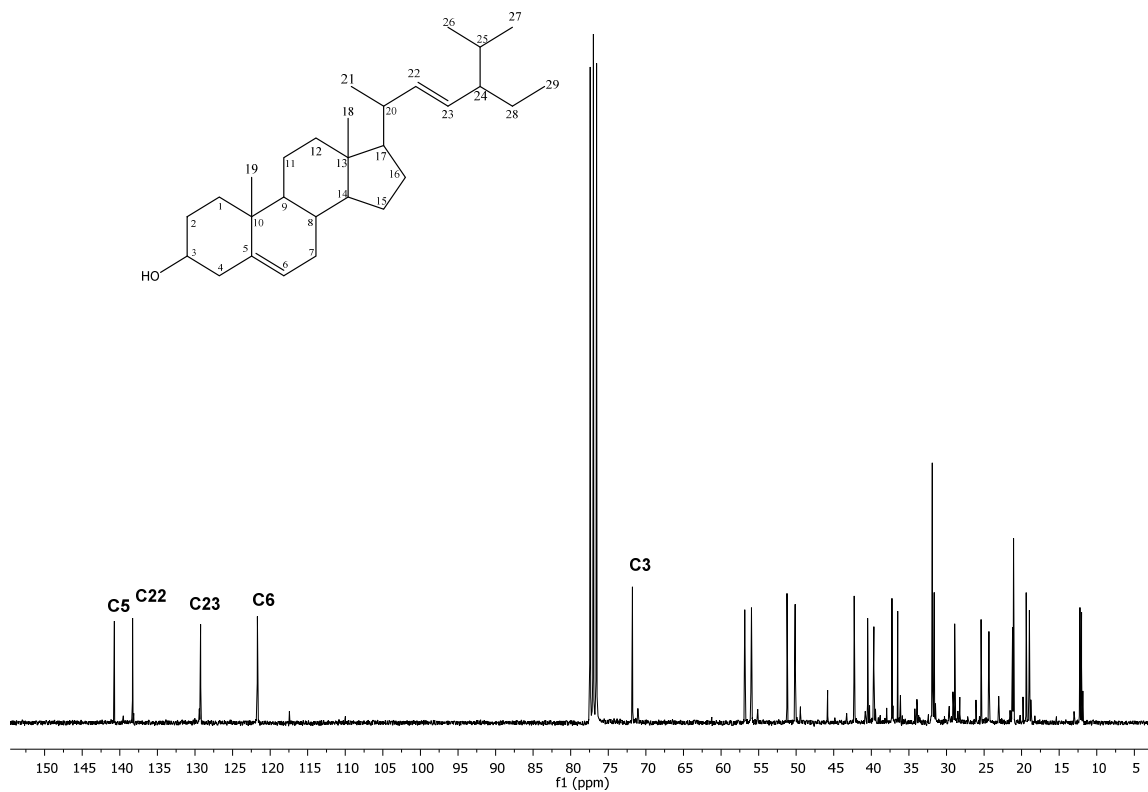
No espectro do RMN de  $^1\text{H}$  do composto (Figura 20), foi verificada a presença de sinais característicos de hidrogênios de esteroides. Observa-se um sinal de singlete largo em  $\delta = 5,35$  (d,  $J = 4,1$  Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio (H-6) ligado ao carbono olefínico C-6 do esteroide. Além disso, notam-se dois duplos dupletos; um em  $\delta = 5,15$  (dd,  $J_{22,23} = 15,2$  e  $J_{22,20} = 8,5$  Hz, 1H) e outro em aproximadamente  $\delta = 5,03$  (dd,  $J_{22,23} = 15,2$  e  $J_{23,24} = 8,2$  Hz, 1H), característicos dos hidrogênios ligados a carbonos olefínicos (C-22 e C-23) da ligação dupla presente na cadeia lateral do estigmasterol. Um multipletto em  $\delta = 3,47-3,55$ , correspondente ao hidrogênio ligado a carbono oximetínico C-3; além dos demais sinais, referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos, os quais não se conseguem distinguir um do outro devido

a sua proximidade. A numeração dos carbonos e hidrogênios está de acordo com a literatura (Inoue et al., 2010).



**Figura 20** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do estigmasterol.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 21) confirmou que o composto isolado é o estigmasterol, devido a que os deslocamentos químicos dos sinais apresentaram-se de acordo com valores da literatura (Miranda et al., 2012). Os deslocamentos e as constantes de acoplamento para H e C podem ser verificados nas tabelas 3 e 4.



**Figura 21** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do estigmasterol.

**Tabela 3:** Comparação dos dados de deslocamento químico ( $\delta$ ) e constante de acoplamento ( $J$ ) obtidos no RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para estigmasterol com os reportados na literatura (Inoue et al., 2010).

H	Estigmasterol $\delta^*_{\text{Ex}}$ (m, J/Hz)	Estigmasterol $\delta^*_{\text{L}}$ (m, J/Hz)
6	5,35 (d, 4,1)	5,36 (d, 4,8)
22	5,15 (dd, 15,2;8,5)	
23	5,03 (dd, 15,2; 8,7)	
3	3,53 (m, 3,53)	

\*Ex: experimental, \*L: literatura.

**Tabela 4:** comparação dos dados de deslocamento ( $\delta$ ) e constante de acoplamento ( $J$ ) obtido no RMN de  $^{13}\text{C}$  para estigmasterol com os reportados na literatura (Miranda et al., 2012).

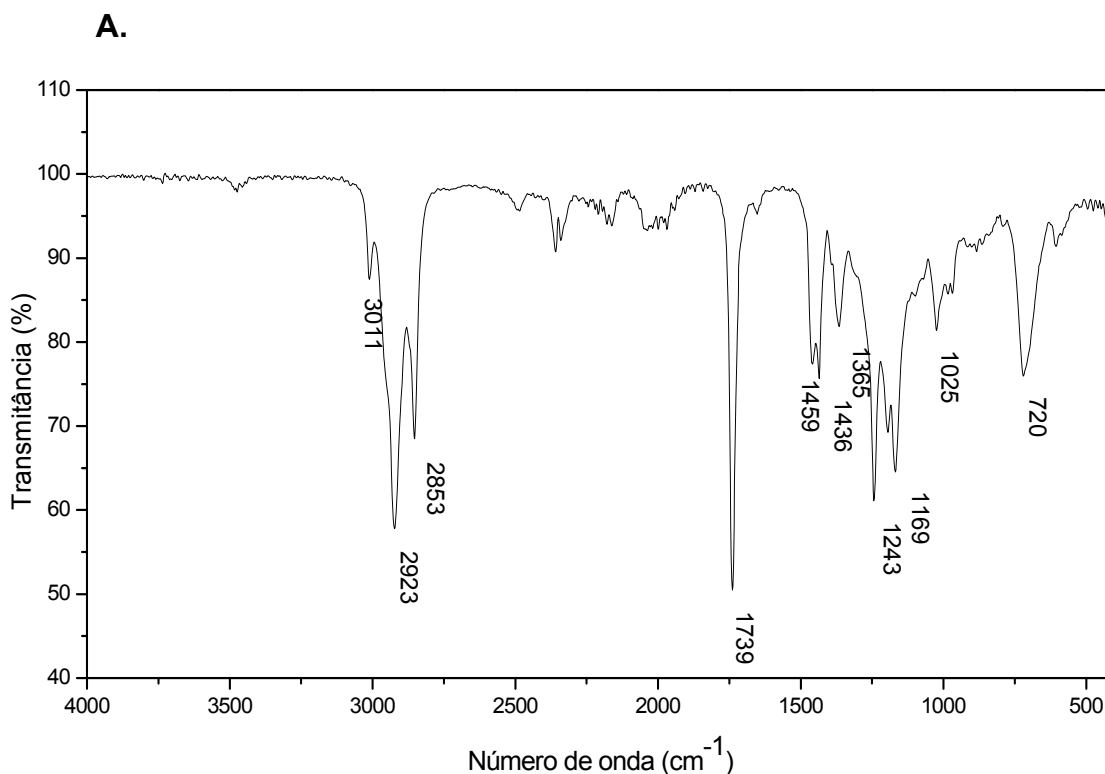
C	$\delta^*_{\text{Ex}}$ (ppm)	$\delta^*_{\text{L}}$ (ppm)	C	$\delta^*_{\text{Ex}}$ (ppm)	$\delta^*_{\text{L}}$ (ppm)
1	37,2	37,2	16	28,9	28,9
2	31,6	31,6	17	56,0	56,0
3	71,8	71,8	18	12,2	12,2
4	42,3	42,3	19	19,4	19,0
5	140,7	140,7	20	40,5	40,4
6	121,7	121,7	21	21,2	21,2
7	31,4	31,6	22	138,3	138,3
8	31,9	31,9	23	129,2	129,2
9	50,1	50,1	24	51,2	51,2
10	36,5	36,5	25	29,1	29,3
11	21,1	21,0	26	21,4	21,3
12	39,7	39,7	27	18,9	18,9
13	56,9	56,8	28	25,4	25,4
14	56,7	56,7	29	12,0	12,2
15	24,3	24,3			

\*Ex: experimental, \*L: literatura.

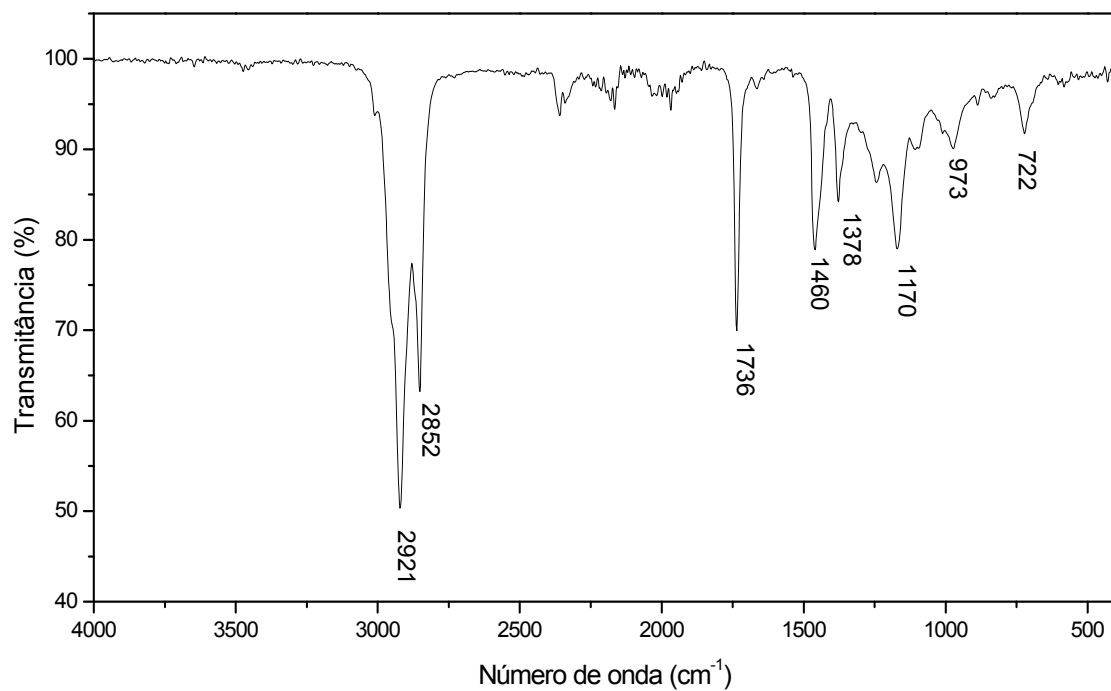
O estigmasterol é um composto químico de natureza esteroidal triterpenoide, considerado um dos mais difundidos entre as espécies vegetais superiores. Foi isolado pela primeira vez em 1906 por Windaus e Hauth, a partir de fava de Calabar (*Physostigma venenosum*). Posteriormente, foi isolado da mistura de esteroides do óleo de soja. O estigmasterol apresenta-se sob a forma de cristais amorfos brancos, insolúvel em água e solúvel nos solventes orgânicos usuais, ponto de fusão 170 °C, o estigmasterol é utilizado para a síntese de hormônios esteroidais, especialmente a cortisona. No entanto, a sua abundância na mistura de esteroides do óleo de soja fez do estigmasterol uma das matérias-primas mais abundantes para a síntese de hormônios esteroidais. Este composto já tinha sido relatado para sementes e folhas de *Mucuna pruriens* (oliveira, 2007 ).

### 3.4 Caracterização das frações D<sub>(10)</sub>2, D<sub>(10)</sub>4, A<sub>(34DA310)</sub>2, e A<sub>(34DA3)</sub>11

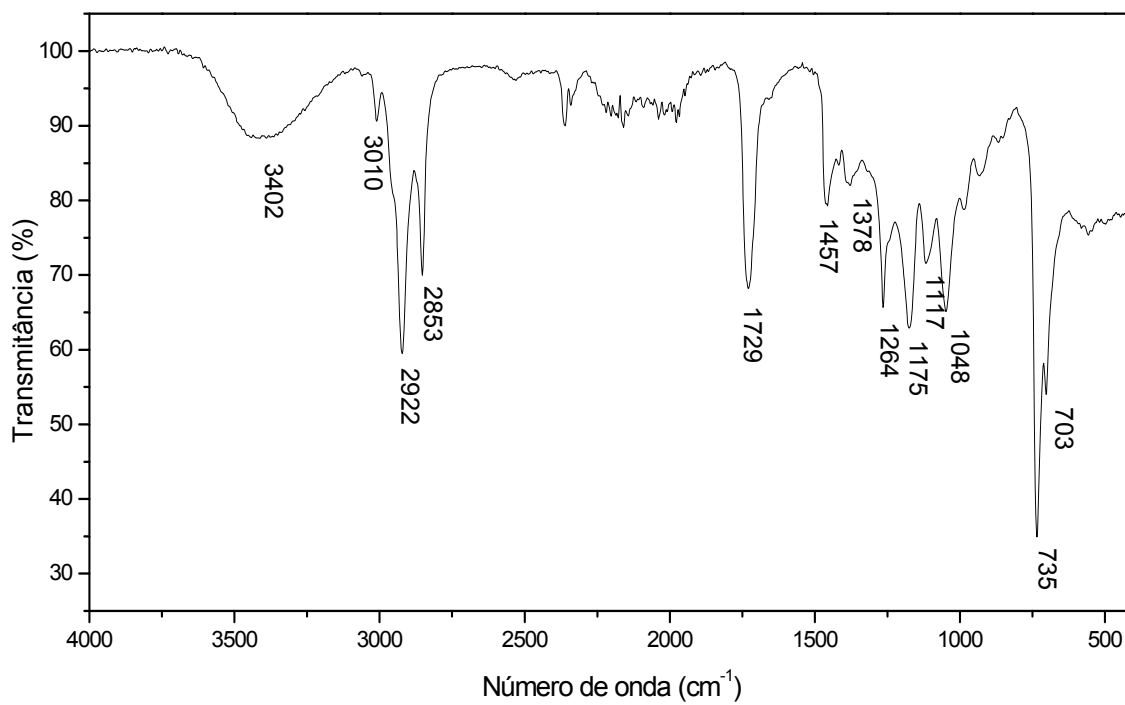
Verifica-se no espectro IV destas frações (Figura 22), um padrão característico de ésteres com uma banda na região de 3475 – 3399 cm<sup>-1</sup>, devidas ao estiramento OH. Bandas na região de 1738 - 1726 cm<sup>-1</sup> são referentes ao estiramento C=O. As bandas de vibrações de estiramento de Csp<sup>2</sup> –H e Csp<sup>3</sup> –H são em 3008 – 2848 cm<sup>-1</sup>, 2922 – 2917 cm<sup>-1</sup> e 2850 – 2848 cm<sup>-1</sup> respectivamente. As bandas em 1460 cm<sup>-1</sup> e 1427 cm<sup>-1</sup>, são referente às vibrações de deformação angular de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> respectivamente. A banda em 1175 - 1024 cm<sup>-1</sup> é produzida pelo estiramento C- CO-O e, finalmente, as bandas em 734 - 715 cm<sup>-1</sup> e 603 cm<sup>-1</sup> são referentes á deformação angular r fora do plano de CH<sub>2</sub>.

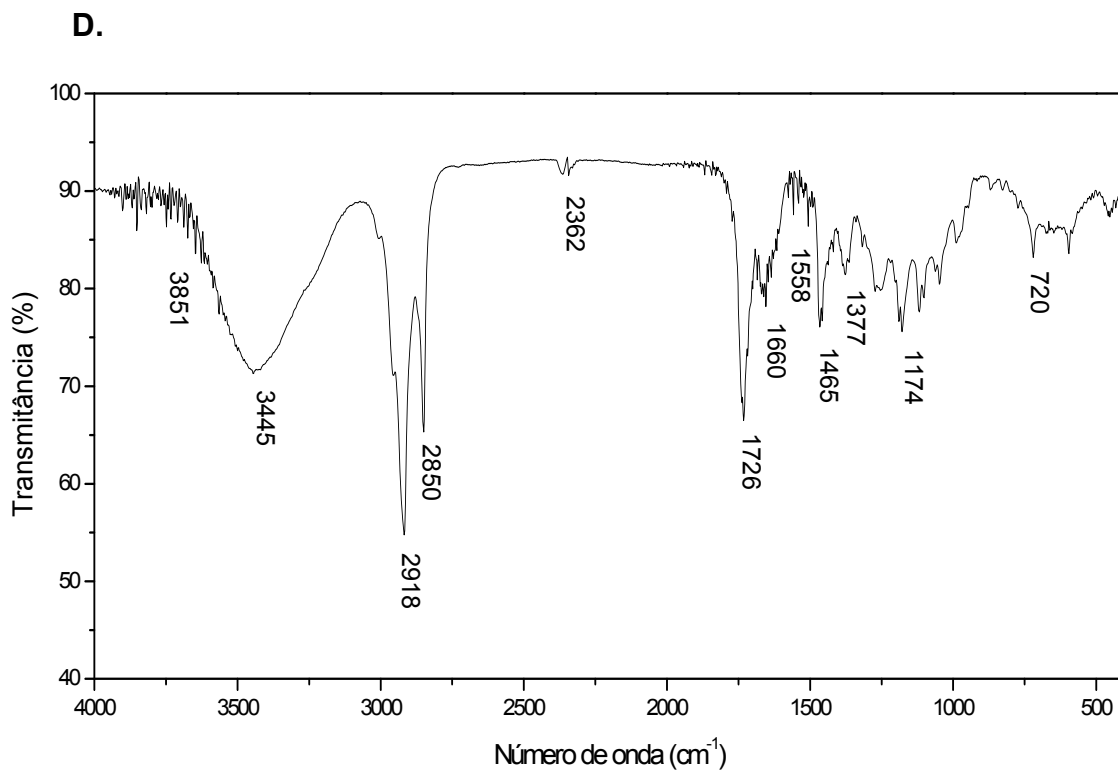


**B.**



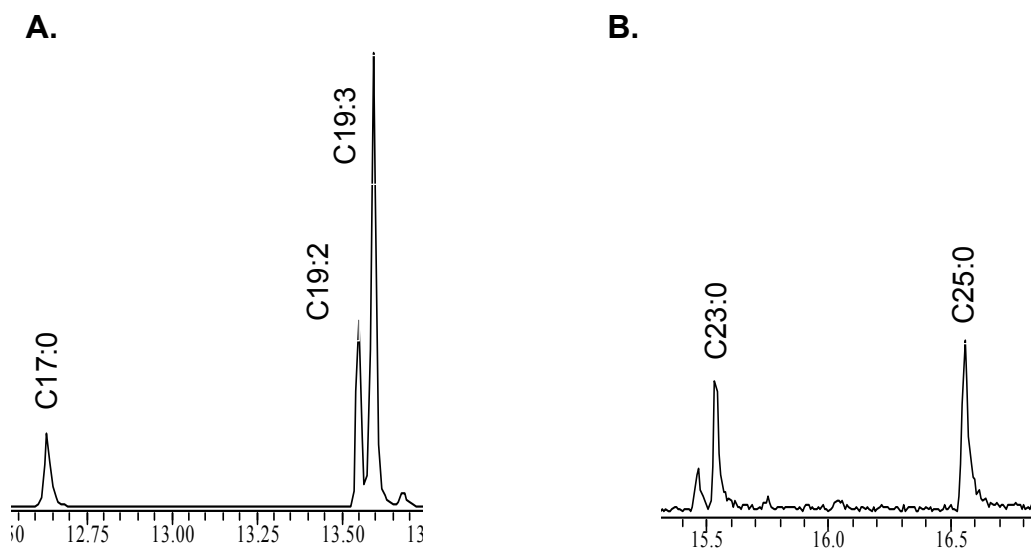
**C.**



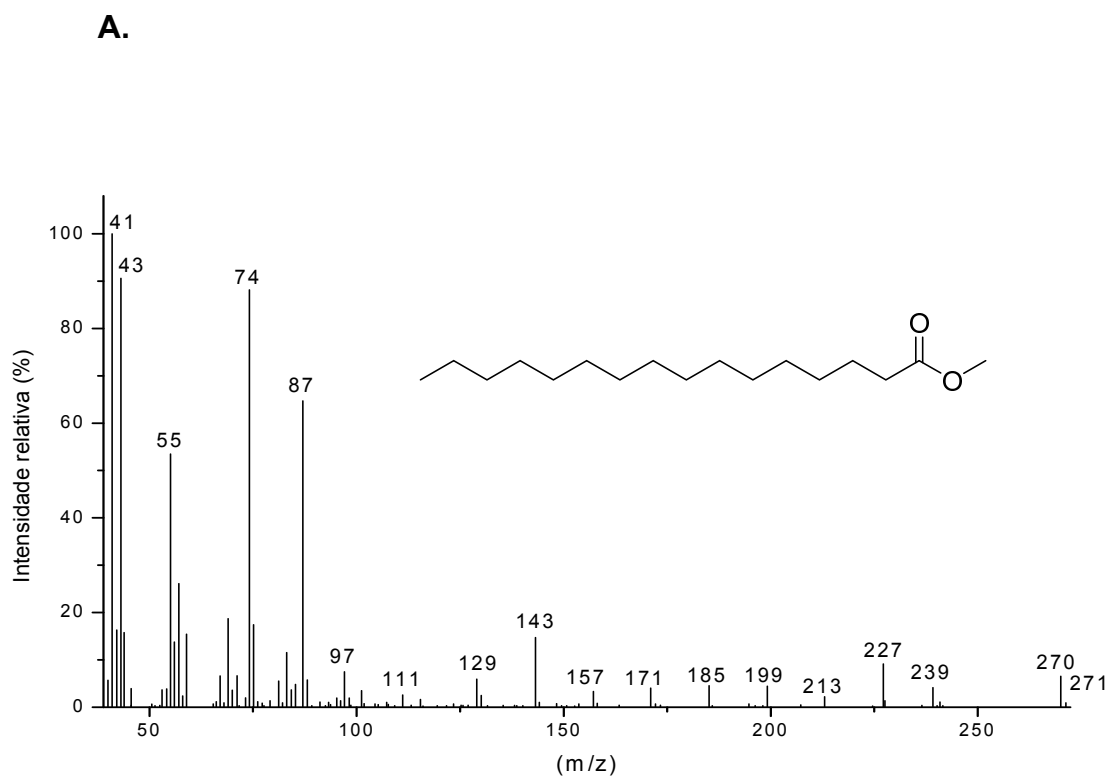


**Figura 22**—Espectro no infravermelho (KBr) das frações **A.** D<sub>(10)</sub>2, **B.** D<sub>(10)</sub>4, **C.** A<sub>(34DA310)</sub>2, e **D.** A<sub>(34DA3)</sub>11.

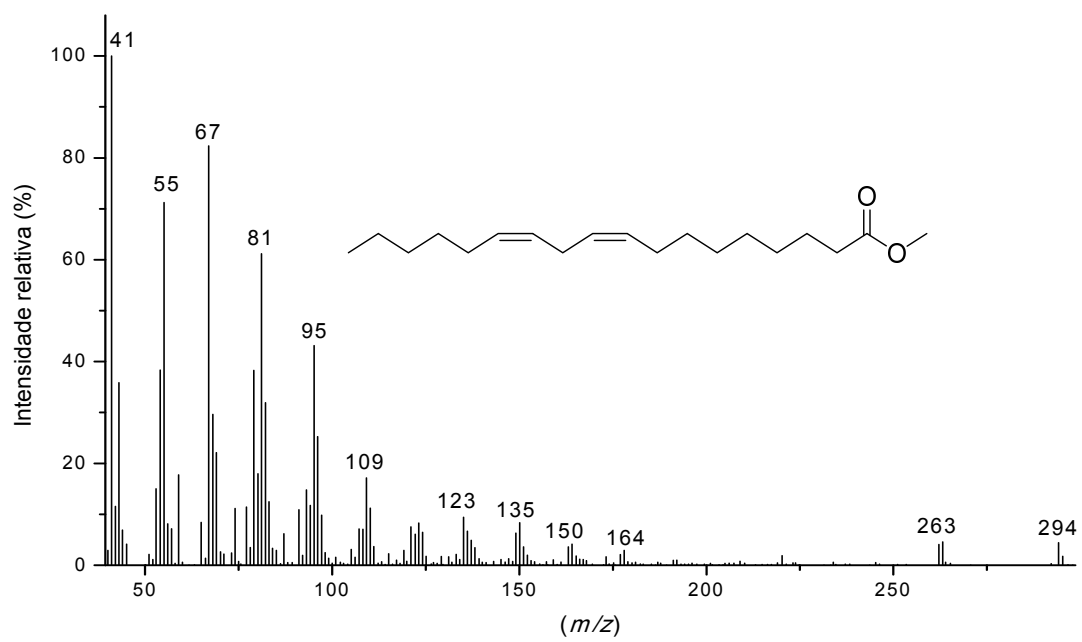
As frações D<sub>(10)</sub>2, D<sub>(10)</sub>4, A<sub>(34DA310)</sub>2, e A<sub>(34DA3)</sub>11 apresentaram espectros de IV característicos de ésteres, fato que levou à realização de derivatização por transesterificação para se conhecer os componentes da mistura. Foram obtidos cromatogramas das frações (Figura 23) e observou-se que D<sub>(10)</sub>2, D<sub>(10)</sub>4 e A<sub>(34DA310)</sub>2 possuíam misturas em diferentes proporções de três ésteres metílicos de ácidos graxos e a fração A<sub>(34DA3)</sub>11 apresentou mistura de ésteres metílicos de dos ácidos graxos diferentes aos encontrados nas outras frações. Os espectros de massas (Figura 24), obtidos por transesterificação das frações permitiram identificá-los como ésteres metílicos de ácido palmítico, linoleico, linolênico, docosanóico e tetracosanóico. Esta identificação foi feita por comparação do da fragmentação de massas dos compostos presente nas frações com as bibliotecas do CG-MS, obtendo uma similaridade de 92% na biblioteca wiley na maioria dos compostos.



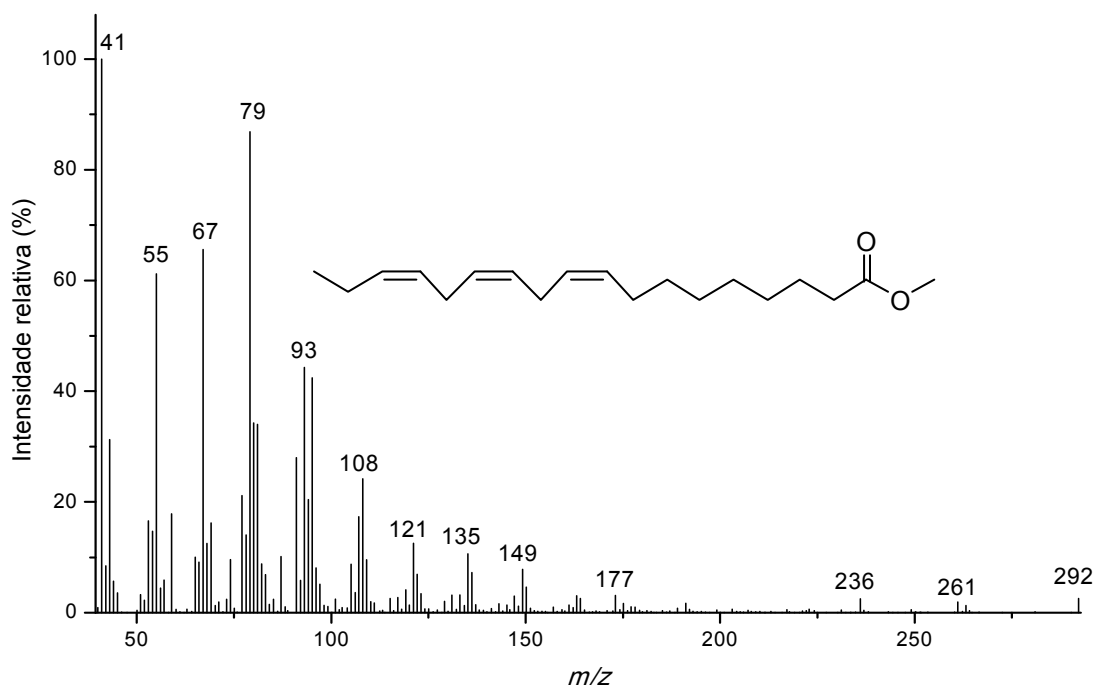
**Figura 23.** Cromatograma dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas frações **A.** D<sub>(10)</sub>2, D<sub>(10)</sub>4 e A<sub>(34DA310)</sub>2 **B.** A<sub>(34DA3)</sub>11.



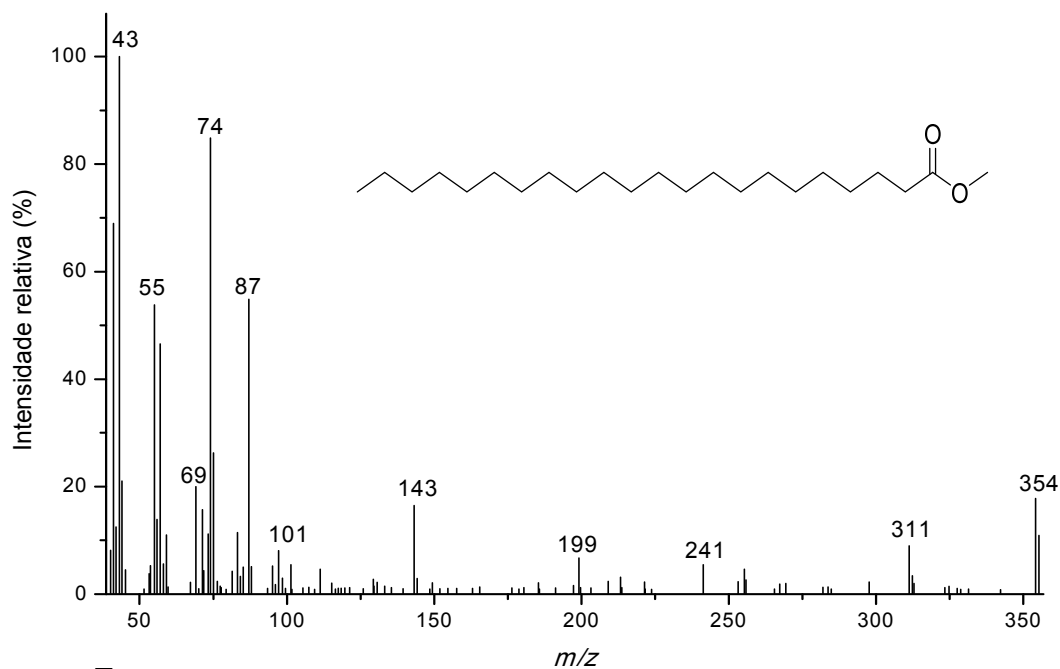
**B.**



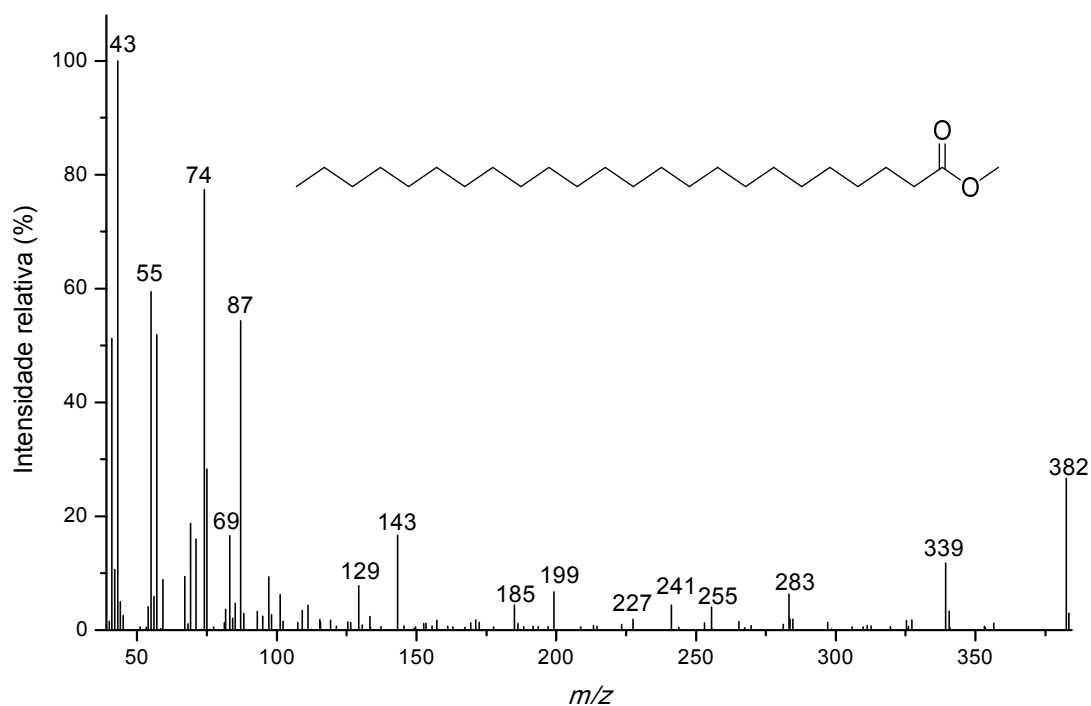
**C.**



**D.**



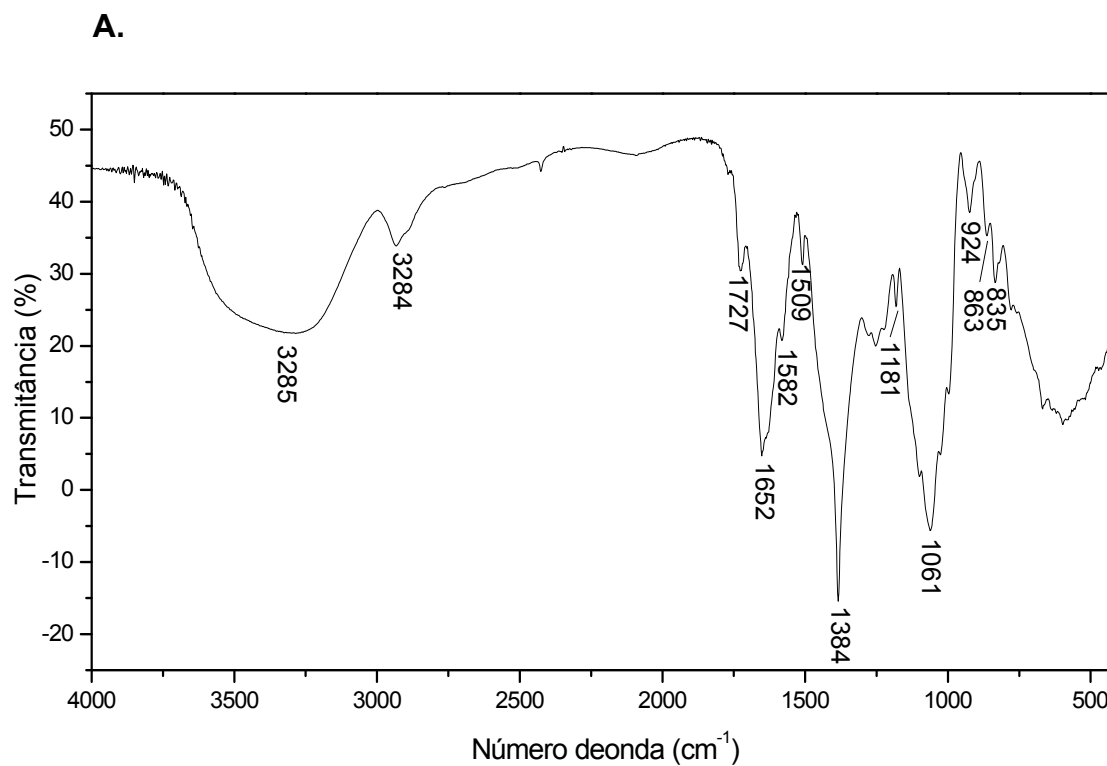
**E.**



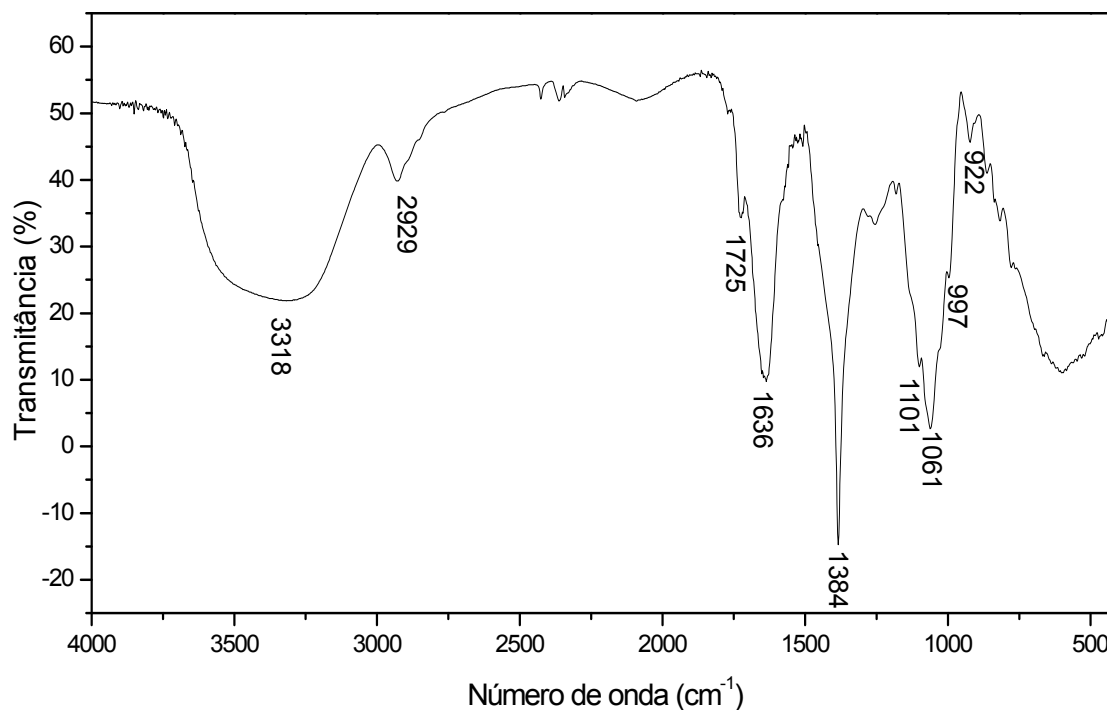
**Figura 23** – Espectro de massas dos ésteres metílicos dos ácidos graxos **A.** palmítico, **B.** linoleico, **C.** linolênico, **D.** docosanoico e **E.** tetracosanoico que compõem as frações  $D_{(10)2}$ ,  $D_{(10)4}$ ,  $A_{(34DA310)2}$ , e  $A_{(34DA3)11}$ .

### 3.5 Caracterização das frações M<sub>(1)1</sub> e M<sub>(1)2</sub>

Observa-se nas frações M<sub>(1)1</sub> e M<sub>(2)2</sub> espectro de IV com bandas em 3318–3285 cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento O-H. Uma banda em 1725 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C=O, bandas em 1652 – 1636 cm<sup>-1</sup>, bandas em 1384 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-O e, finalmente, uma banda em 1061 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-O-C (Figura 24).



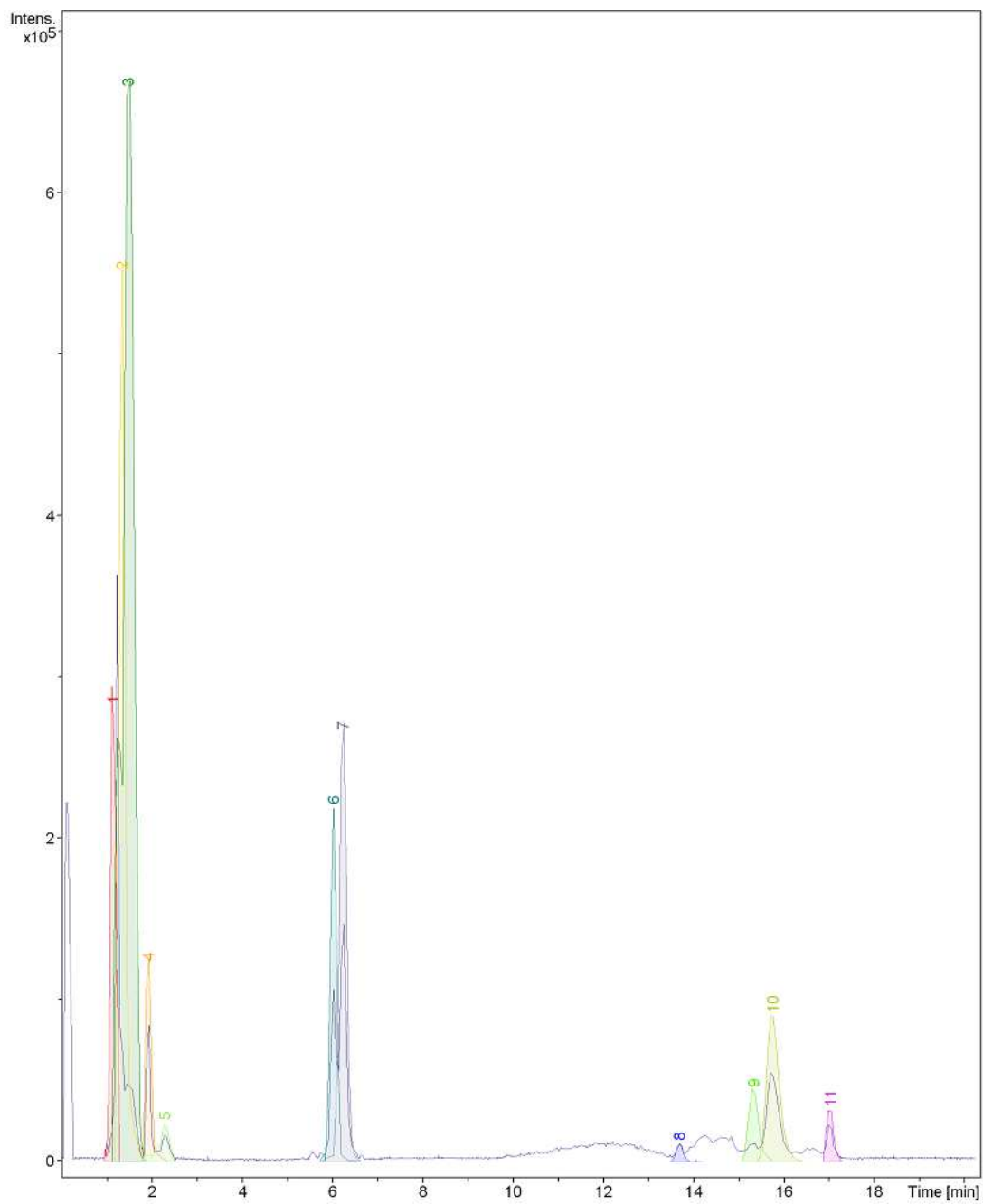
**B.**



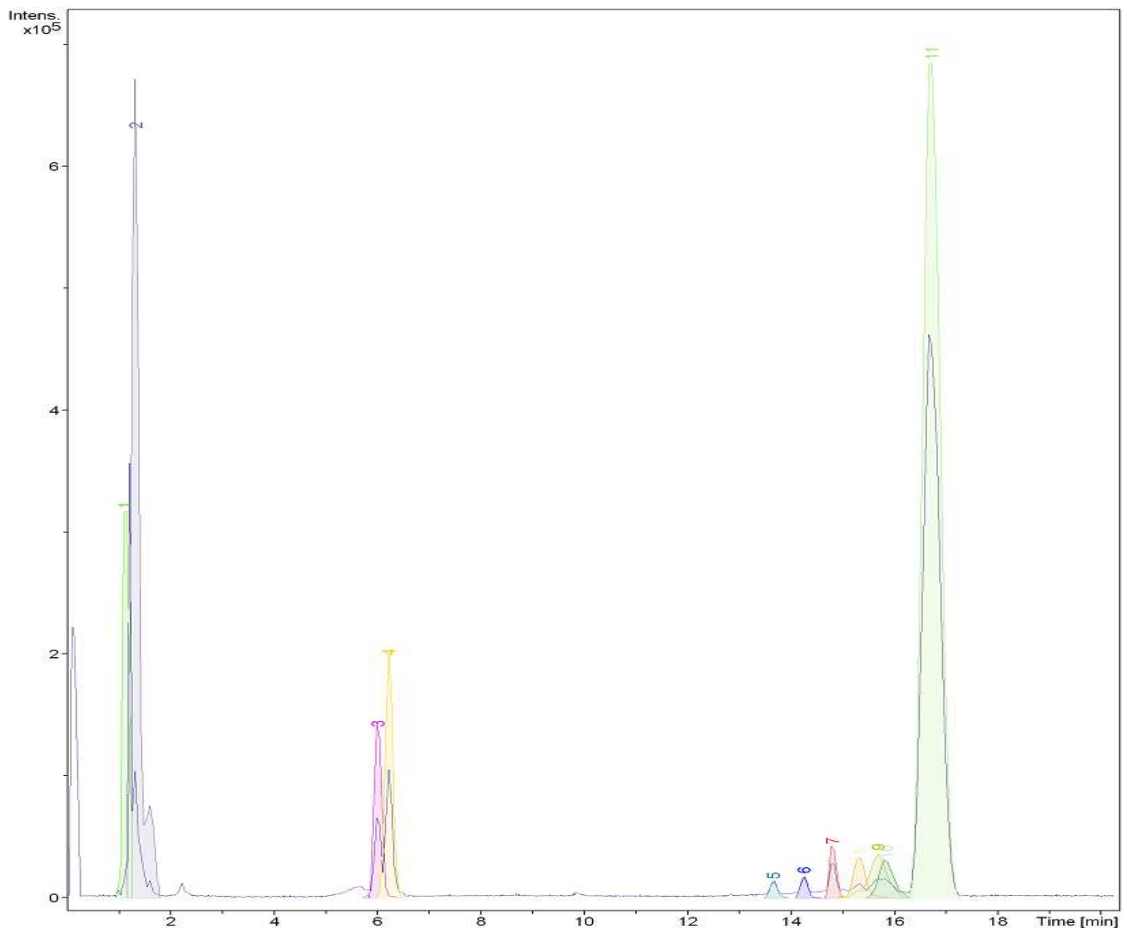
**Figura 24**—Espectro no infravermelho (KBr) das frações **A.**  $M_{(1)1}$  e **B.**  $M_{(1)2}$ .

As frações  $M_{(1)1}$  e  $M_{(1)2}$  foram analisadas por LC-ESI-MS/MS. Obteve-se cromatogramas do íon total com a dissecação de cada um dos picos, das duas amostras (Figura 25), nos quais são apresentados 11 picos e foram identificados dois deles. A detecção dos compostos foi realizada por dissecação do pico cromatográfico com posterior determinação da fórmula molecular em concordância com a massa exata e o isótopo padrão (MSI) e base de dados de espectros de fragmentos (MS2). Fontes de referências de espectros de fragmentos comerciais ou de compostos isolados que foram identificados, assim como da base de dados pública MassBank (Horai et al., 2010).

**A.**

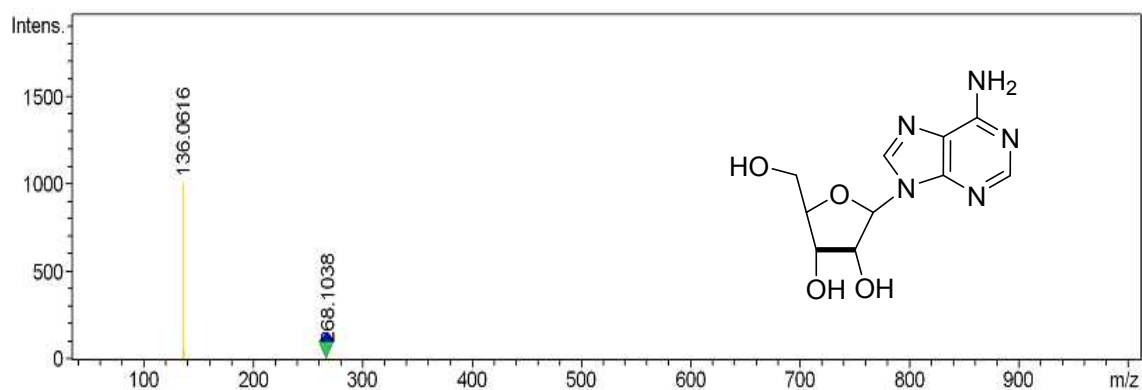


**B.**



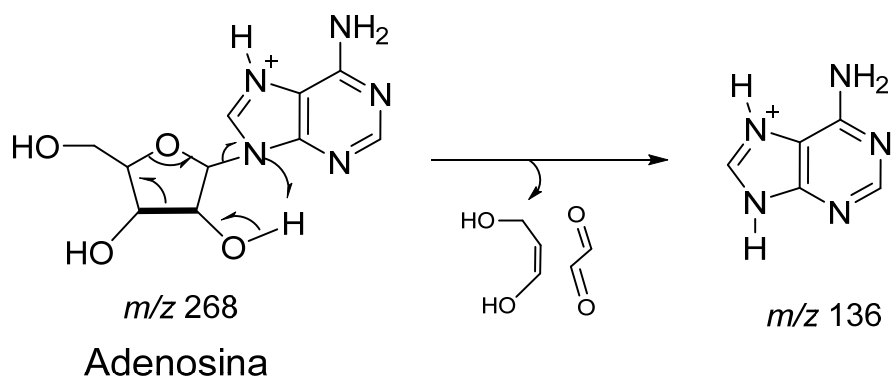
**Figura 25-**Cromatogramas do íon total e da dissecação das frações **A.**  $M_{(1)1}$  e **B.**  $M_{(1)2}$ .

Para a fração  $M_{(1)1}$  o composto referente ao pico **4** foi Identificado como adenosina com uma massa exata de 267,1040 g/mol e fórmula molecular  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , uma purina endógena sintetizada da degradação de aminoácidos como metionina, treonina, valina e isoleucina. A adenosina regula processos fisiológicos, como a neurotransmissão e fluxo sanguíneo, em uma escala de tempo de minutos a horas (Nguyen e Venton, 2015). Este pico apresenta um tempo de retenção ( $t_r$ ) de 1,4 minutos e produz um íon  $[M+H]^+$  de  $m/z = 268$  formando um aduto com o íon hidrogênio. Além disso, é observado um fragmento em  $m/z = 136$  no espectro MS/MS (Figura 26).



**Figura 26-** Espectro de MS/MS do composto **4** da fração  $M_{(1)1}$  identificado como adenosina.

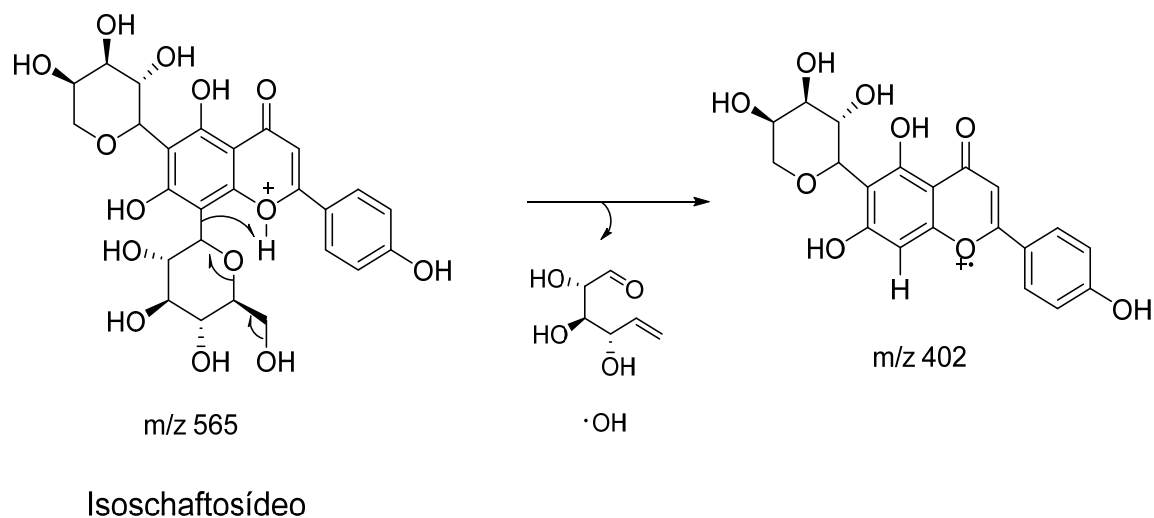
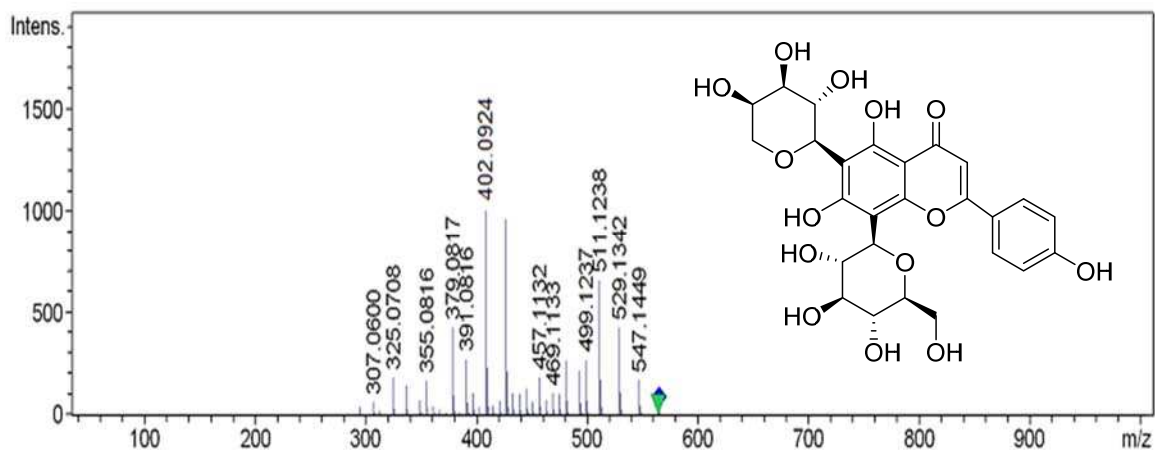
Foi realizada a fragmentação da molécula, obtendo-se um fragmento em  $m/z = 136$  que corresponde á perda de adenina, caraterístico para este composto (Figura 27).



**Figura 27-** Fragmento em  $m/z = 136$  para a adenosina.

Para a fração  $M_{(1)2}$  foi identificado o composto referente ao pico **4** como isoschaftosídeo com uma massa exata de 564.1561 g/mol e fórmula molecular  $C_{26}H_{28}O_{14}$ . Isoschaftosídeo é uma di-C-glicosilflavona alelopática, biossintetizado através de glicosilação sequencial e arabinosilação de 2-hidroxinaringenina com UDP-glicose e UDP-arabinose. A conversão completa para a flavona requer a desidratação química implicando uma enzima desidratase que tem um papel in

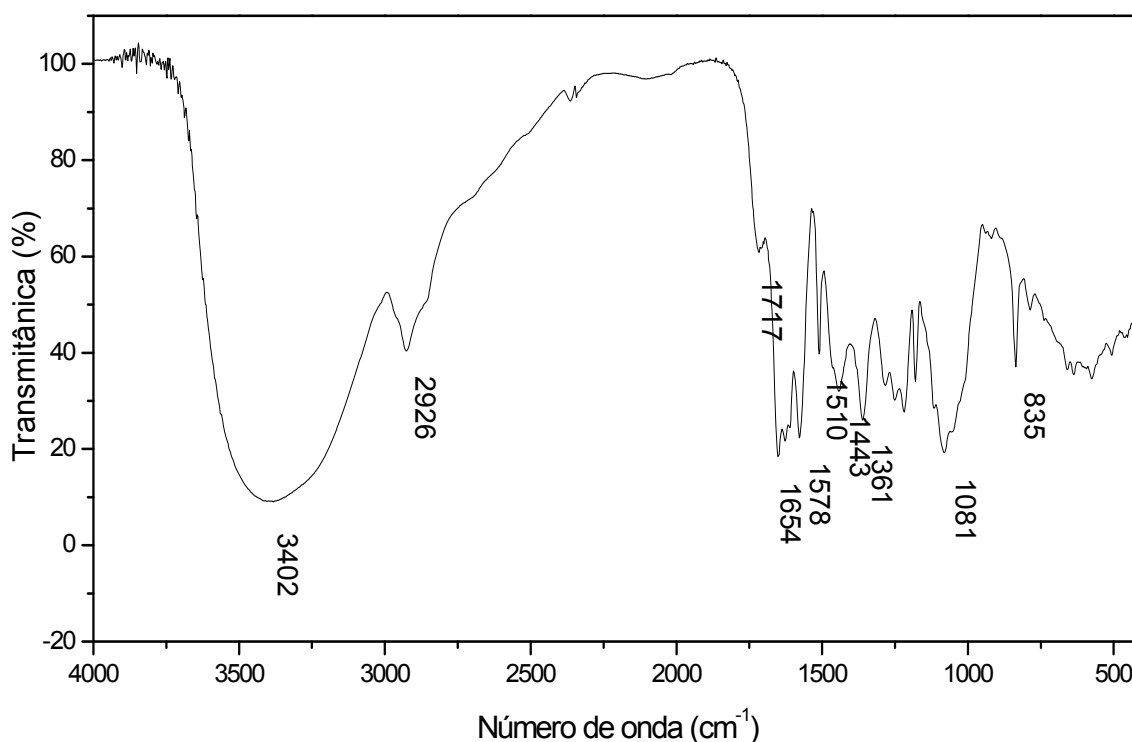
vivo para completar a biossíntese (Hamilton et al., 2012). Este possui um  $t_r$  de 6,2 min com íon  $[M+H]^+$  de  $m/z = 565$  fragmento em  $m/z = 402$  no espectro MS/MS (Figura 28) correspondente á perda da glicose.



**Figura 28**-Espectro de MS/MS do composto **4** da fração  $M_{(1)2}$  identificado como isoschaftosídeo e fragmento em  $m/z = 402$ .

### 3.6 Caracterização da fração M<sub>(1)4</sub>

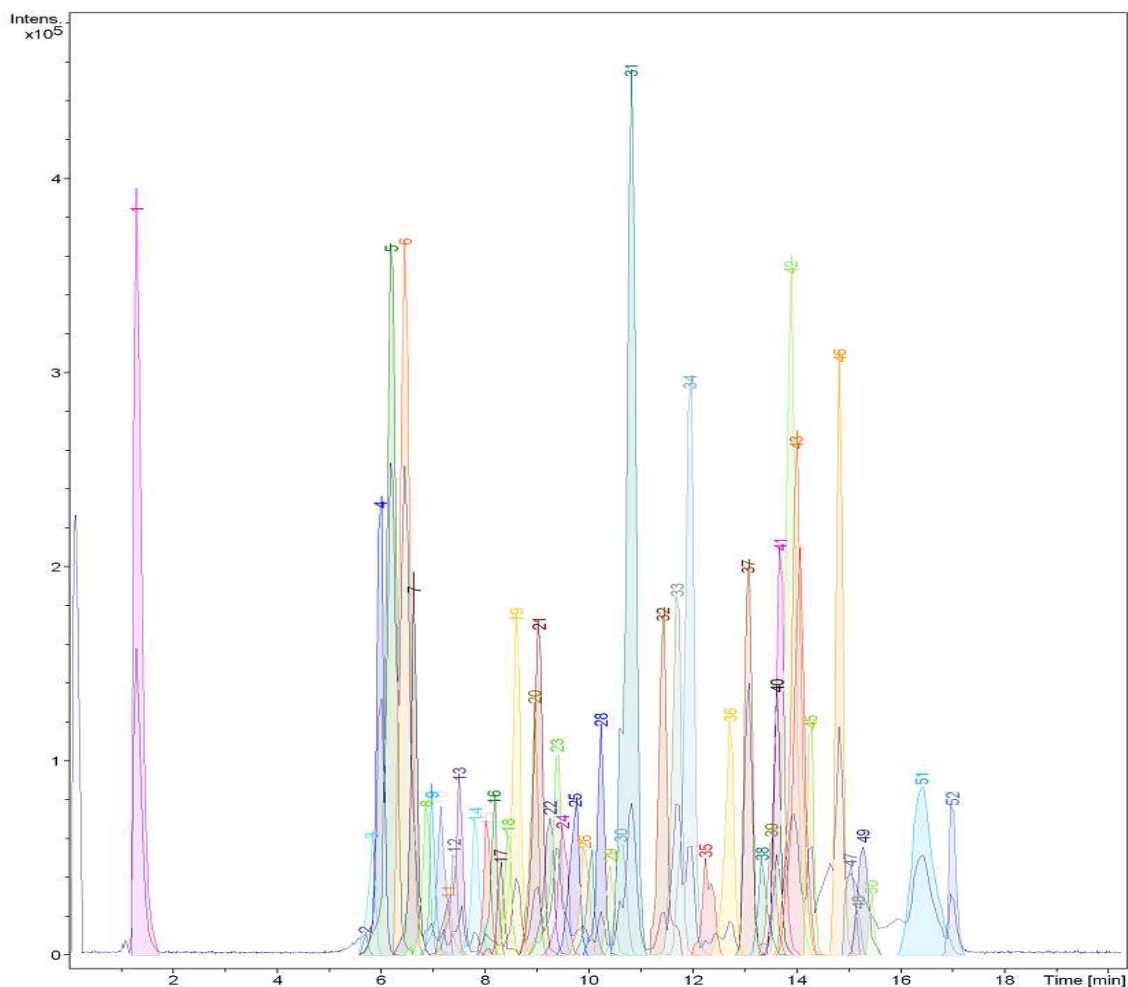
Na fração M<sub>(1)4</sub> observa-se um espectro de IV com uma banda em 3402 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento O-H. Banda em 2926 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento de COOH, uma banda em 1717 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C=O, também bandas em 1654 cm<sup>-1</sup> e 1361 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-O e, finalmente, uma banda em 1081 cm<sup>-1</sup> devida ao estiramento C-O-C (Figura 29).



**Figura 29-** Espectro no infravermelho (KBr) da fração M<sub>(1)4</sub>.

A fração M<sub>(1)4</sub> foi analisada por HPLC-MS para caracterizar compostos presentes nela, a caracterização foi realizada da mesma forma que para as frações anteriores.

Foi obtido o cromatograma do íon total com dissecação dos picos da fração, no qual nota-se a presença de 53 compostos dos quais só foram identificados 4 que correspondem aos picos **5, 7, 8 e 16** (Figura 30).

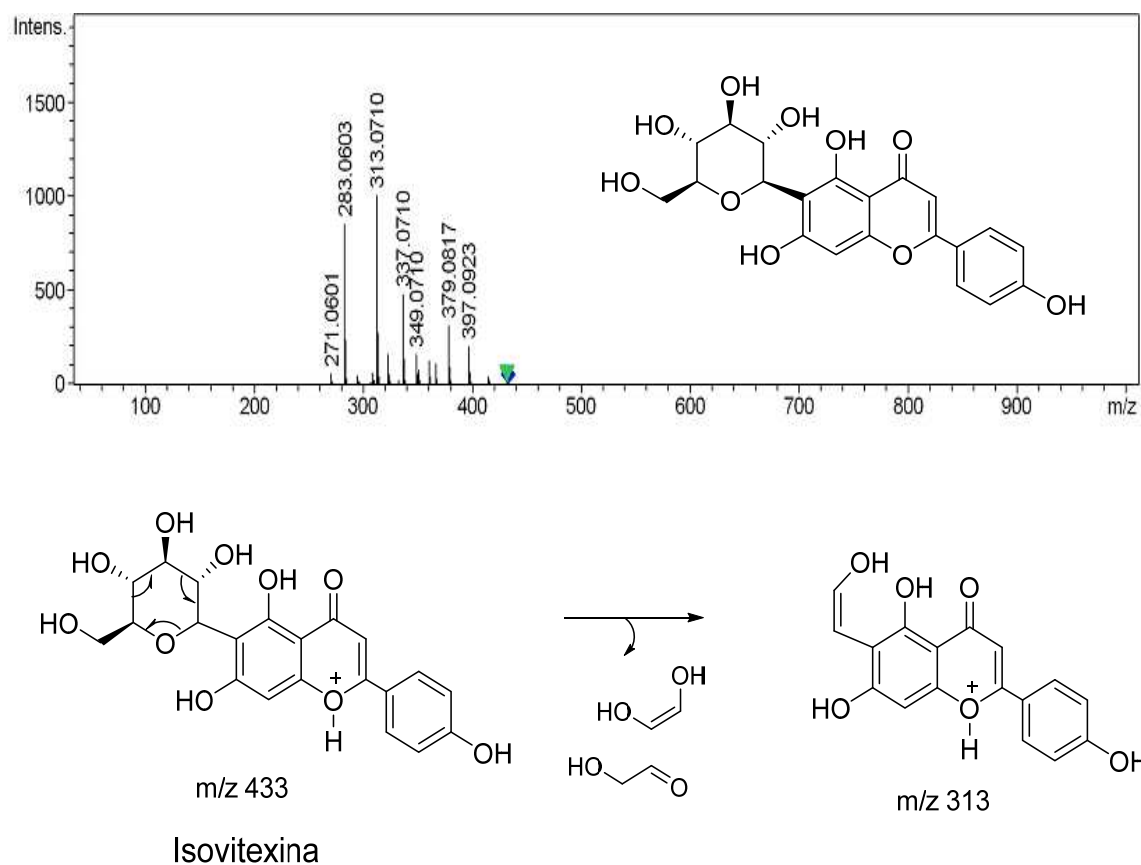


**Figura 30-** Cromatograma do íon total com dissecação dos picos da fração  $M_{(1)4}$ .

Para o pico **5** foi identificado como Isoschaftosídeo com uma massa exata de 564.1561 g/mol e fórmula molecular  $C_{26}H_{28}O_{14}$ , o qual é uma flavona glicosilada que já tinha sido identificado numa fração anterior.

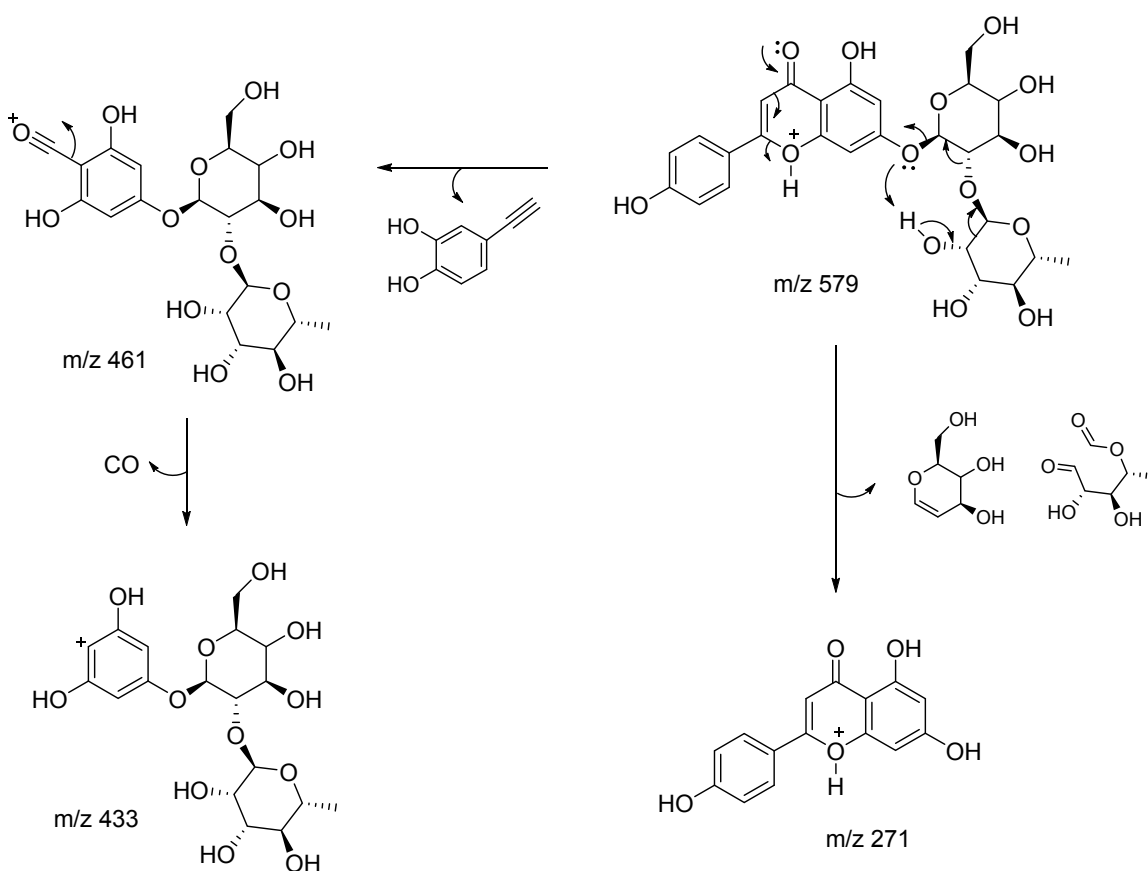
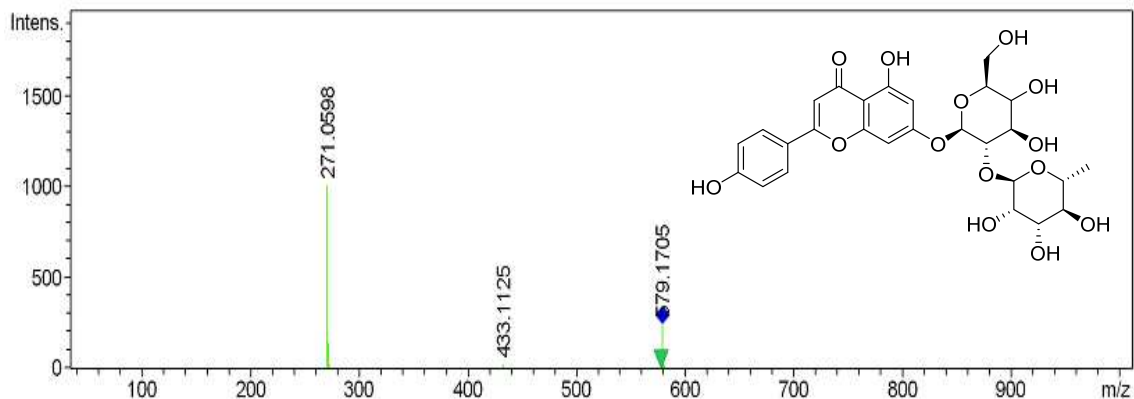
O pico **7** foi identificado como isovitexina com uma massa exata de 432.1131 g/mol e fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{10}$ . É um flavonoide glicosilado que possui uma atividade antioxidante potencial, o qual tem sido isolado das partes aéreas de *Passiflora incarnata*. Estudos recentes demonstraram a atividade farmacocinética da isovitexina no plasma de sangue de rato, no entanto, sem detalhar o alvo molecular e as forças que governam a interação físico-química (Caruso et al., 2014). Este pico apresenta um tempo de retenção ( $t_r$ ) de 6,6 minutos e produz um íon  $[M+H]^+$  de  $m/z = 433$  formando um aduto com o íon

hidrogênio. Além disso, é observado um fragmento em  $m/z = 313$  no espectro MS/MS que corresponde a uma fração da glicose ligada na aglicona (Figura 31).



**Figura 31-** Espectro de MS/MS do composto **7** da fração  $M_{(1)4}$  identificado como isovitexina e fragmento em  $m/z = 313$ .

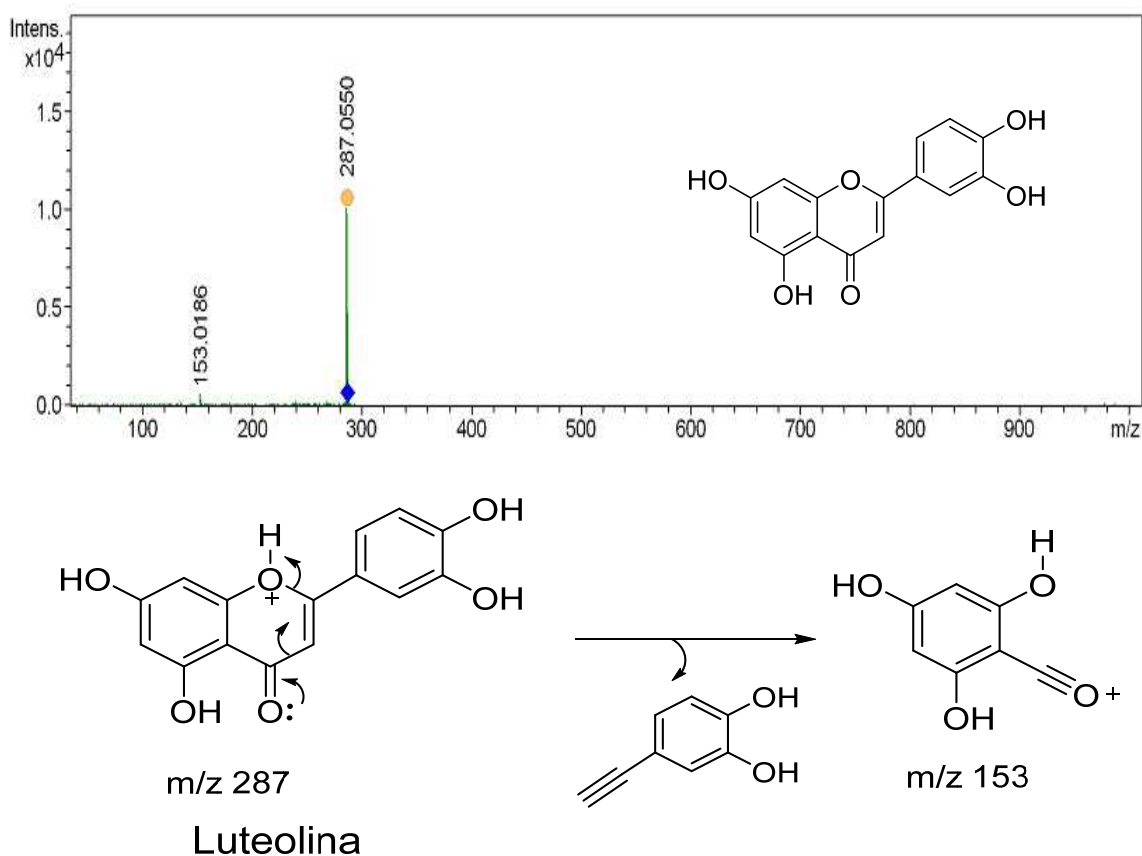
O pico **8** é referente à rhoifolina com uma massa exata de 578.1707 g/mol e fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{14}$ , é um composto da família das flavonas, é realmente uma flavona glicosilada denominada 7-O-neohesperidosido da apigenina que ocorre juntamente com a naringenina na casca de limão, laranja amarga, e em folhas de toronja (Ishii et al., 1994). Este pico apresenta um tempo de retenção ( $t_r$ ) de 6,9 minutos e produz um íon  $[M+H]^+$  de  $m/z = 579$  formando um aduto com o íon hidrogênio, além disso são observados fragmentos em  $m/z = 433$  e  $m/z = 271$  no espectro MS/MS que correspondem aos fragmentos do dissacarídeo ligado na apigenina (Figura 32).



**Figura 32-** Espectro de MS/MS do composto **8** da fração M<sub>(1)</sub>4 identificado como rhoifolina e fragmentos em  $m/z = 433$  e 271.

O pico **16** e referente à Luteolina com massa exata de 286.1256 g/mol e fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> (Figura 31). É um componente ativo encontrado pela

primeira vez em *Folium perillae* e *Flosloni cerae* possui uma inibição in vitro específica sobre fosfodiesterase 4 (PDE4). A luteolina apresenta efeitos farmacológicos antiinflamatório, anti-tumoral, anti-anafilaxia, antioxidante, e proteção do sistema nervoso e tem sido utilizado principalmente para tratar a doença respiratória inflamatória, câncer e doenças cardiovasculares (Jiang et al., 2015). Este pico possui um tempo de retenção ( $t_r$ ) de 8,2 min e produz um íon  $[M+H]^+$  de  $m/z = 287$  formando um aduto com o íon hidrogênio, além disso observou-se um fragmento em  $m/z = 153$  no espectro MS/MS que indica a presença de substituintes dihidroxil no anel A, o que confirma a identidade do composto (Figura 33).

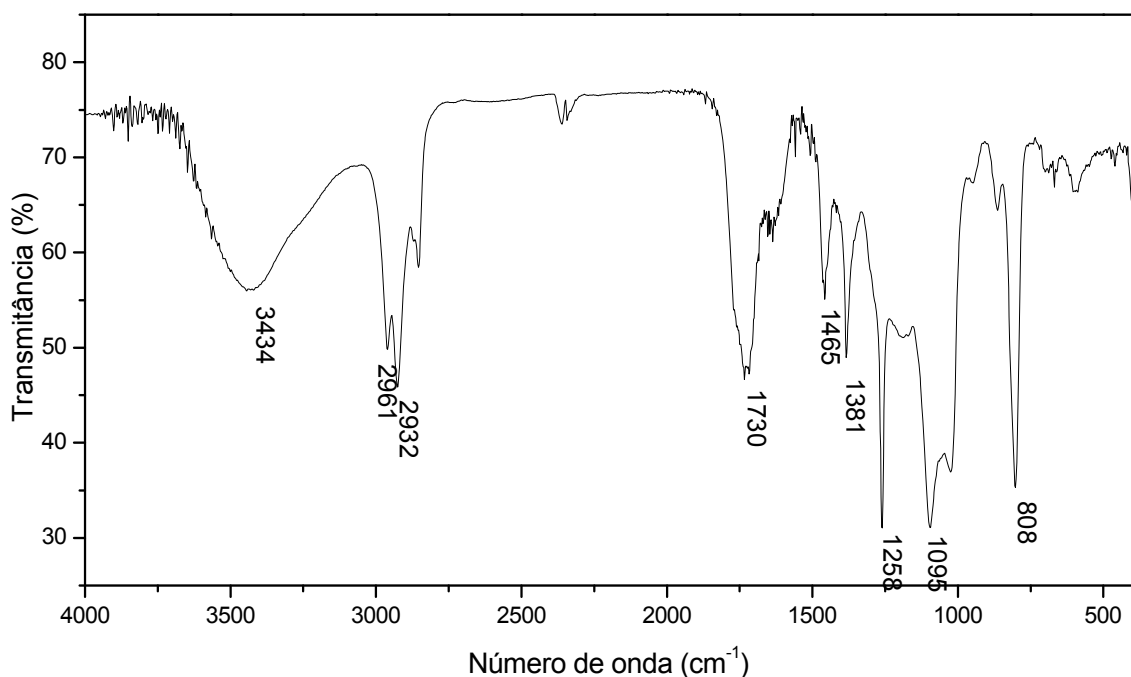


**Figura 33-** Espectro de MS/MS do composto **16** da fração  $M_{(1)4}$  identificado como luteolina e fragmento em  $m/z = 153$ .

Os compostos identificados por LC-ESI-MS/MS são na sua maioria do tipo flavonoides os quais apresentam diferentes atividades biológicas e que ainda não estão reportados na literatura para a espécie *Mucuna pruriens*.

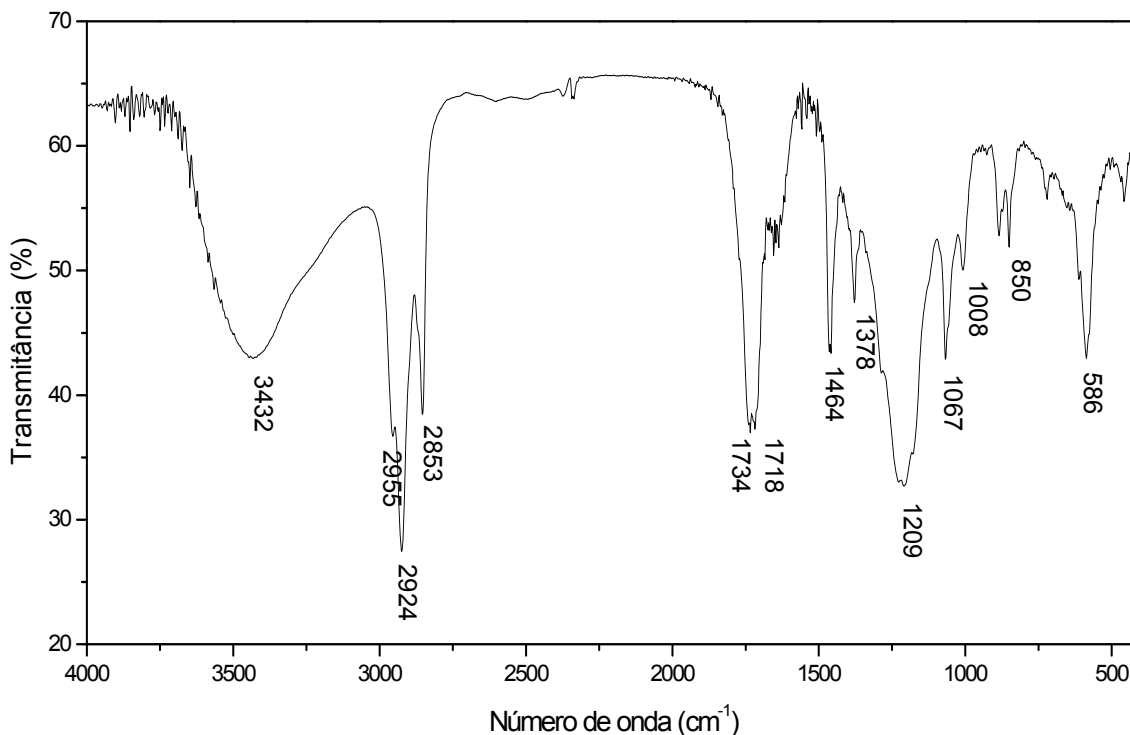
### 3.7 Caracterização do extrato e das frações LA e LM dos exsudados radiculares de *Mucuna pruriens*

Observa-se no espectro de infravermelho do extrato dos exsudados radiculares de *M. pruriens* bandas características de estiramento de O-H em  $3434\text{ cm}^{-1}$ . Também se notam bandas em  $2961\text{ cm}^{-1}$  e  $2932\text{ cm}^{-1}$  referentes às vibrações de estiramento  $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ . A banda em  $1730\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento C=O para ésteres, a banda em  $1465\text{ cm}^{-1}$  é referente às vibrações de deformação angular de  $\text{CH}_2$ . A banda em  $1258\text{ cm}^{-1}$  é devida ao estiramento C-O-C, a banda em  $1095\text{ cm}^{-1}$  produzida pelo estiramento C-CO-O e, finalmente, uma banda forte e aguda em  $808\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação angular fora do plano de  $\text{CH}_2$  (Figura 34).



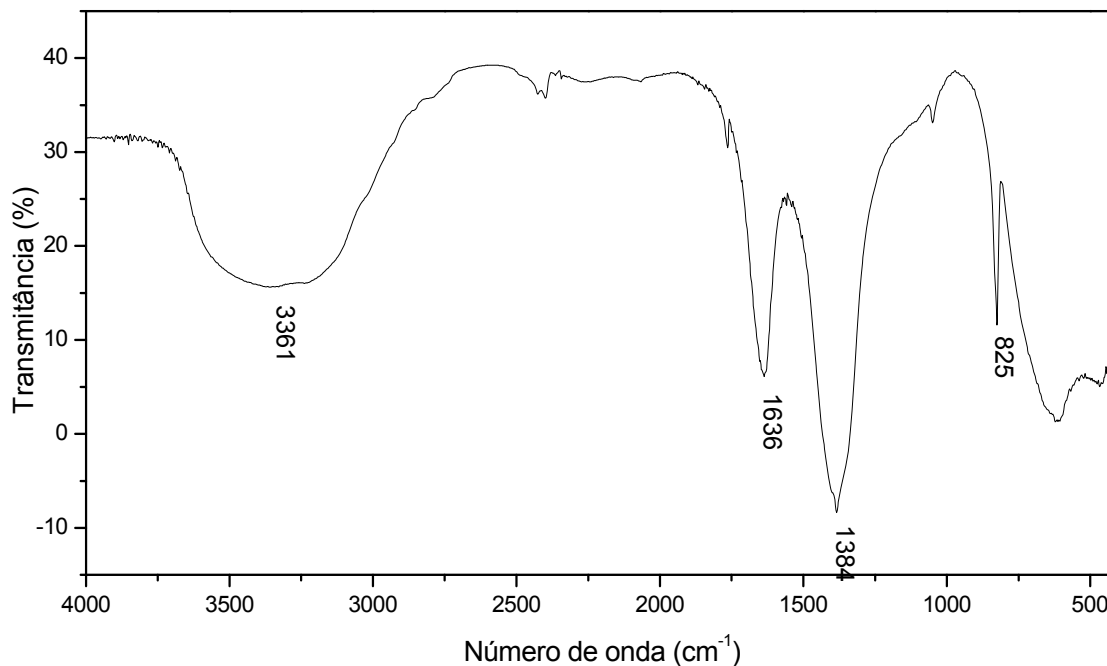
**Figura 34**-Espectro no infravermelho (KBr) do extrato dos exsudados radiculares de *Mucuna pruriens*.

No espectro IV da fração LA observam-se bandas característica em 3432  $\text{cm}^{-1}$  devida ao estiramento O-H. Bandas em 2924 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a vibrações de estiramento de  $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$  e  $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ , uma banda presente em 1717  $\text{cm}^{-1}$  referente a estiramento  $\text{C=O}$ , banda em 1209  $\text{cm}^{-1}$  devida a vibrações de estiramento C-O-C, e finalmente apresenta uma banda de deformação angular de C-CO-C em 585  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 35).



**Figura 35**-Espectro no infravermelho (KBr) da fração em acetato de etila do liofilizado dos exsudados de *Mucuna pruriens*.

No espectro de IV (Figura 36) para a fração LM do liofilizado dos exsudados de *Mucuna pruriens* verifica-se uma banda característica de estiramento O-H em 3361  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, nota-se uma banda em 1636  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento  $\text{C=O}$ , a banda em 1384  $\text{cm}^{-1}$  devida ao estiramento C-O. Finalmente, uma banda em 825  $\text{cm}^{-1}$  é referente à deformação angular fora do plano de CH.

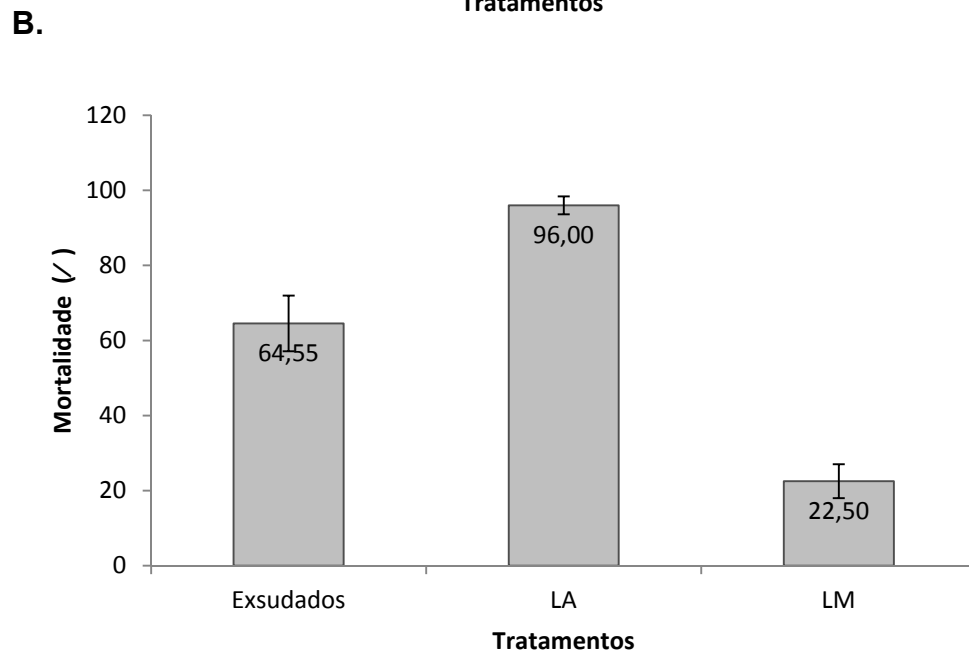
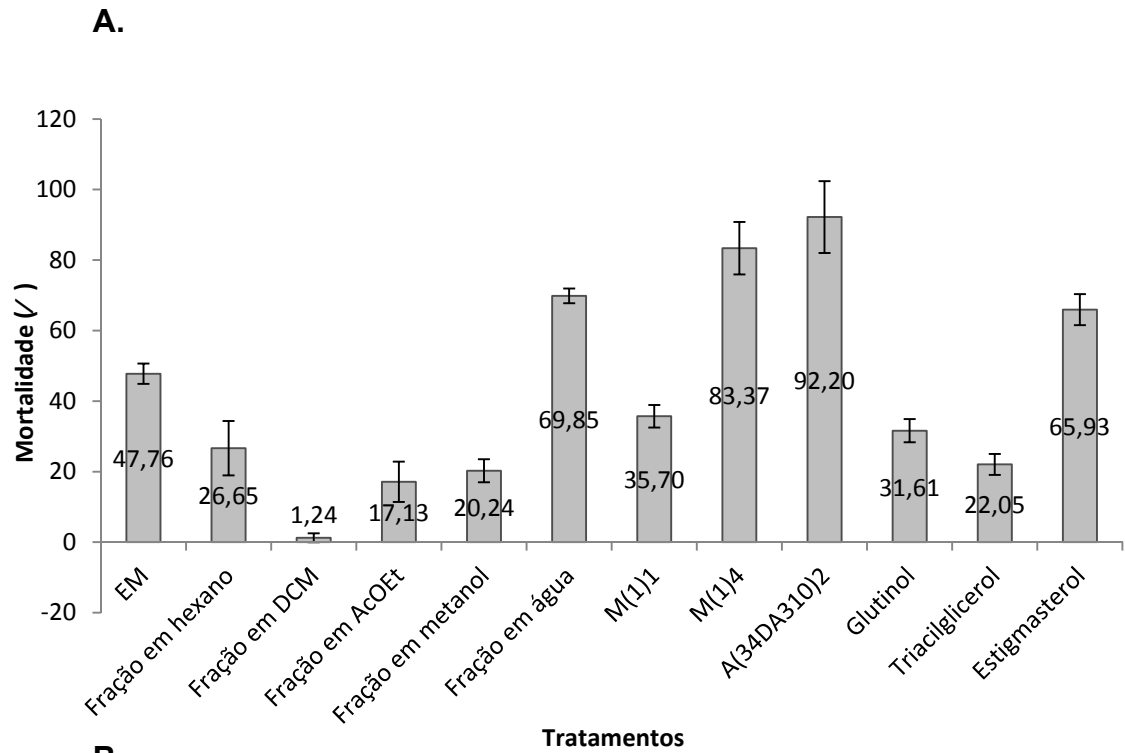


**Figura 36**-Espectro no infravermelho (KBr) da fração em metanol do liofilizado dos exsudados de *Mucuna pruriens* var. *utilis*.

O extrato dos exsudados radiculares e as frações em acetato de etila (LA) e metanol (LM) do resíduo liofilizado, obtido do cultivo hidropônico de *Mucuna pruriens* foram submetidos a análises de HPLC-MS para caracterizar os compostos presentes neles. Infelizmente não foi possível sua caracterização mesmo devido a esta técnica ser muito interessante para a identificação do peso molecular ou fórmula molecular. Entretanto, ela representa inconvenientes para estudos estruturais de elucidação, que são baseados na fragmentação dos íons. Por outro lado, as bibliotecas espectrais utilizadas neste estudo foram insuficientes para conseguir a identificação dos compostos presentes no extrato e nas frações de exsudados radiculares.

### **3.8 Avaliação da atividade nematicida**

A avaliação da atividade nematicida dos extratos e frações da parte aérea e exsudados radiculares de *Mucuna pruriens* foi realizada sobre juvenis do segundo estágio de nematoide *Meloidogyne javanica*. Os tratamentos testados correspondem ao extrato bruto metanólico, frações do extrato metanólico obtidas da coluna filtrante, compostos isolados, exsudados radiculares e frações do material liofilizado, obtido dos exsudados radiculares de *Mucuna pruriens*. Cada tratamento foi realizado por quintuplicata em uma concentração de 100 ppm. Foi utilizada água como testemunha no caso dos extratos, frações e compostos puros de folhas e caule. Também foi testada a solução hidropônica utilizada para a obtenção dos exsudados radiculares. Esta solução não teve a testemunha, fato pelo qual, foi utilizada como testemunha para a análise dos dados correspondentes aos exsudados e as frações em acetato de etila e metanol obtidas do material liofilizado. Os resultados do teste nematicida são apresentados a seguir (Figura 37).



**Figura 37** – Histograma da porcentagem de mortalidade dos extratos e frações da parte aérea de *M. pruriens*. **A.** extrato e frações dos exsudados radiculares de *M. pruriens* a 100 ppm. **B.** sobre juvenis do nematoide das galhas *Melodogyne javanica*.

Em geral, pode-se notar que tanto o extrato metanólico como as frações e os compostos testados de folhas e caule de *Mucuna pruriens*, apresentam uma porcentagem de mortalidade menor que 70%. A exceção é a fração M<sub>(1)4</sub> que apresentou uma porcentagem de inibição de 83,37 % e a fração A<sub>(34DA310)2</sub> com 92,20% de inibição. No caso da fração A<sub>(34DA310)2</sub>, que é uma mistura de ácidos graxos, o resultado está de acordo com estudos realizados que relatam atividade deste tipo de compostos (Barbosa et al., 1999). No caso da fração M<sub>(1)4</sub> proveniente da fração metanólica composta de constituintes polares, onde estão presentes flavonas glicosiladas que poderiam ser os responsáveis pela atividade, segundo relatos de atividade nematicida para compostos como pruretina, um isoflavonoide, isolado de *Mucuna cinerea* (Demuner et al., 2003). Estes resultados mostram que em relação ao nematoide *Meloidogyne javanica* a atividade encontra-se relacionada com mais de uma classe de compostos (ácidos graxos e flavonoides).

No caso dos exsudados radiculares a porcentagem de mortalidade foi de 64,55% o que não apresenta um efeito significativo do tratamento sobre os juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. Aliás, a fração em acetato de etila (LA) obtida do liofilizado dos exsudados radiculares de *Mucuna pruriens* causou uma porcentagem de inibição de 92,20% em relação ao controle sobre este gênero de nematoides. Como já foi mencionado, não foi possível isolar nenhum dos compostos presentes nesta fração. No entanto as substâncias como triterpenos, esteróis e flavonoides glicosilados podem ter efeito desfavorável para nematoides podem estar presentes nesta fração, o que poderia ser uma explicação para a alta porcentagem de mortalidade exibida.

Estes resultados favoráveis no controle de *Meloidogyne javanica* são importantes e a caracterização dos compostos presentes nos extratos obtidos desta planta deve ser continuada com vistas à obtenção de compostos nematicidas a partir de produtos naturais sem efeitos secundários desfavoráveis para os seres humanos e o meio ambiente.

#### 4. CONCLUSÕES

Foi obtido extrato dos exsudados radiculares de *Mucuna pruriens* por meio de cultivo hidropônico, assim como frações em acetato de etila e metanol do material liofilizado proveniente da hidroponia. Tanto o extrato como as frações foram avaliadas contra o nematoide das galhas *Meloidogyne javanica*.

Foi obtido o extrato metanólico de folhas e caule de *Mucuna pruriens*, utilizando a técnica de extração por maceração, e deste extrato foram obtidas frações com misturas de ácidos graxos e flavonoides. Foram isolados e identificados três compostos: um triacilglicerol, Estigmasterol e Glutinol, dos quais este último não foi relatado na literatura ainda para esta planta.

Foram identificados os compostos Adenosina, Isoschaftosídeo, Isovitexina, Rhoifolina e Luteolina presentes nas frações M<sub>(1)</sub>1 e M<sub>(1)</sub>4 obtidas da fração em metanol da parte aérea de *Mucuna pruriens* utilizando LC-ESI-MS/MS dos quais não se tem relatos na literatura para esta planta.

Foi realizado ensaio de atividade nematicida para o extrato metanólico, frações e compostos isolados de folha e caule, e também o extrato e as frações de exsudados radiculares de *Mucuna pruriens* sobre *Meloidogyne javanica*. As frações M<sub>(1)</sub>4, A<sub>(34DA310)</sub>2 e LA apresentaram porcentagens de controle de nematoides maior que 70%, confirmando o fato da mucuna ser uma planta utilizada como adubo verde que ajuda na diminuição e controle biológico de nematoides.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, v. 74 (1), p. 35-47, **2000**

Bae, S. S., A HPLC/ESI-MS Method Developed and Validated to Evaluate the Quantity, Identity, and Stability of the Alkylamides in Ethanolic Extracts of *Spilanthes Acmella*, University of North Carolina at Greensboro, **2007**

BARBOSA, L. C. A.; BARCELOS, F. F.; DEMUNER, A. J. E SANTOS, M. A. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. *Nematropica*, v. 29 (1), p 81-88, **1999**

Barbosa, L. C. d. A., Espectroscopia no Infravermelho. Editora UFV, p. 14-189, **2007**

CARUSO, Í. P.; VILEGAS, W.; DE SOUZA, F. P.; FOSSEY, M. A. E CORNÉLIO, M. L. Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 98 (0), p 100-106, **2014**

CHIKAGWA-MALUNGA, S. K.; ADESOGAN, A. T.; SALAWU, M. B.; SZABO, N. J.; LITTELL, R. C.; KIM, S. C. E PHATAK, S. C. Nutritional characterization of *Mucuna pruriens*: 2. In vitro ruminal fluid fermentability of *Mucuna pruriens*, *Mucuna l-dopa* and soybean meal incubated with or without l-dopa. *Animal Feed Science and Technology*, v. 148 (1), p 51-67, **2009**

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C.; NASCIMENTO, J. C.; VIEIRA, J. J. E SANTOS, M. A. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de Constituintes Químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. *Química Nova*, v. 26 (3), p 335-339, **2003**

DIAS, H. J.; MELO, N. I. D. E CROTTI, A. E. M. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry as a Tool for the Structural Elucidation and Dereplication of Natural Products: An Overview. *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. Prasain, J. K., InTech, p 595-618, **2012**

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V. E CARNEIRO, G. E. D. S. Nematoides em Soja: Identificação e Controle. *Circular Técnica 76 EMBRAPA* , p 2176 - 2864, **2010**

DU, Q. E LI, B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation–DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity. *Food Chemistry*, v.131 (4), p 1181-1186, **2012**

HAMILTON, M. L.; KUATE, S. P.; BRAZIER-HICKS, M.; CAULFIELD, J. C.; ROSE, R.; EDWARDS, R.; TORTO, B.; PICKETT, J. A. E HOOPER, A. M. Elucidation of the biosynthesis of the di-C-glycosylflavone isoschaftoside, an allelopathic component from *Desmodium spp.* that inhibits *Striga spp.* development. *Phytochemistry*, v. 84 (0), p 169-176, **2012**

HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T.; SUWA, K.; OJIMA, Y.; TANAKA, K.; TANAKA, S.; AOSHIMA, K.; ODA, Y.; KAKAZU, Y.; KUSANO, M.; TOHGE, T.; MATSUDA, F.; SAWADA, Y.; HIRAI, M. Y.; NAKANISHI, H.; IKEDA, K.; AKIMOTO, N.; MAOKA, T.; TAKAHASHI, H.; ARA, T.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; NEUMANN, S.; IIDA, T.; TANAKA, K.; FUNATSU, K.; MATSUURA, F.; SOGA, T.; TAGUCHI, R.; SAITO, K. E NISHIOKA, T. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45 (7), p 703-714, **2010**

HUISDEN, C. M.; SZABO, N. J.; OGUNADE, I. M. E ADESOGAN, A. T. *Mucuna pruriens* detoxification: Effects of ensiling duration and particle size. *Animal Feed Science and Technology*, v. 198 (0), p 20-27, **2014**

HUMPHREYS-PEREIRA, D. A. E ELLING, A. A. Mitochondrial genomes of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. incognita* (Nematoda: *Tylenchina*): Comparative analysis, gene order and phylogenetic relationships with other nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.194 (1–2), p 20-32, **2014**

INAMDAR, S.; JOSHI, S.; BAPAT, V. E JADHAV, J. Innovative use of *Mucuna monosperma* (Wight) callus cultures for continuous production of melanin by using statistically optimized biotransformation medium. *Journal of Biotechnology*, v. 170 (0), p 28-34, **2014**

INOUE, M. H.; SANTANA, D. C.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; POSSAMAI, A. C. S.; SILVA, L. E. E DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*). *Planta Daninha*, v. 28, p 735-741, **2010**

ISHII, K.; URANO, S.; FURUTA, T. E KASUYA, Y. Determination of rhoifolin and daidzin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 655 (2), p 300-304, **1994**

JIANG, D.-X.; LIU, S.-R.; ZHANG, M.-H.; ZHANG, T.; MA, W.-J.; MU, X. E CHEN, W. Luteolin prevents fMLP-induced neutrophils adhesion via suppression of LFA-1 and phosphodiesterase 4 activity. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 14 (1), p 140-147, **2015**

KAYANI, M. Z.; HUSSAIN, M. A. E UL-HAQUE, M. I. Infestation assessment of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) associated with cucumber in the Pothowar region of Pakistan. *Crop Protection*, v. 47, p 49-54, **2013**

LEE, M. K.; LEE, K. Y.; JEON, H. Y.; SUNG, S. H. E KIM, Y. C. Antifibrotic activity of triterpenoids from the aerial parts of *Euscaphis japonica* on hepatic stellate cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 24.6, p 1276-1279, **2009**

LÍSA, M. E HOLCAPEK, M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1198–1199 (0), p 115-130, **2008**

LUC, M.; SIKORA, R. A. E BRIDGE, J. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Oxon: CAB international Institute of Parasitology, p 629, **1990**

MAJEKODUNMI, S. O.; OYAGBEMI, A. A.; UMUKORO, S. E ODEKU, O. A. Evaluation of the anti–diabetic properties of *Mucuna pruriens* seed extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 4 (8), p 632-636, **2011**

MARTÍNEZ, A. M. Esteroles. Tesis (Maestría en ciencias químicas - Química Farmacéutica), Universidad de Antioquia, p 37, **2002**

MIRANDA, M. L. D.; SOUZA, A. F.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. E ABOT, A. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). *Química Nova*, v. 35, p 1306-1311, **2012**

MISRA, L. E WAGNER, H.. Alkaloidal constituents of *Mucuna pruriens* seeds. *Phytochemistry*, v. 65 (18), p 2565-2567, **2004**

MUKHTAR, T.; HUSSAIN, M. A.; KAYANI, M. Z. E ASLAM, M. N. Evaluation of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars. *Crop Protection*, v. 56 (0): 25-30, **2014**

MUSHTAQ, M. N.; SUNOHARA, Y. e MATSUMOTO, H. Allelochemical I-DOPA induces quinoprotein adducts and inhibits NADH dehydrogenase activity and root growth of cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 70 (0), p 374-378, **2013**

NGUYEN, M. D. E VENTON, B. J. Fast-scan Cyclic Voltammetry for the Characterization of Rapid Adenosine Release. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 13 (0), p 47-54, **2015**

NOGUEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, J. S. E FERAZ, S. Nematicidal hydrocarbons from *Mucuna aterrima*. *Phytochemistry*, v. 42 (4), p 997-998, **1996**

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—A review. *Applied Soil Ecology*, v. 44, p 101-105, **2010**

OLIVEIRA, A. B. Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., (Msc. em Ciências Farmacêuticas) MUSACEAE Ciências Farmacêuticas. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, **2007**

OLIVEROS-BASTIDAS, A. D. J.; ANTONIO, J. D. E LUIZ CLÁUDIO DE ALMEIDA, B. Chemical characterization by GC-MS and phytotoxic potential of non-polar and polar fractions of seeds of *Dioteryx odorata* (Aubl.) Willd. from Venezuelan regions. *Química Nova*, v. 36, p 502-506, 2013

RIBEIRO, H. B.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; CAMPOS, V. P.; DIAS-ARIEIRA, C. R. E MIZOBUTSI, E. H. Resíduos de frutos de pequi no controle do nematoide das galhas em tomateiro. *Horticultura Brasileira*, v. 30, p 453-458, **2012**

ROJANO-DELGADO, A. M.; CRUZ-HIPOLITO, H.; PRADO, R.; CASTRO, M. D. L. E FRANCO, A. R. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants. *Phytochemistry*, v.73, p 34-41, **2012**

SHARMA, A.; SHARMA, S. E DALELA, M. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. *Microbial Pathogenesis*, v. 75 (0), p 16-20, **2014**

SILVA, F. C.; DUARTE, L. P. E VIEIRA FILHO, S. A. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. *Revista Virtual de Química*, v. 6 (5), p 1205-1220, **2014**

SURESH, S.; PRITHIVIRAJ, E.; VENKATA LAKSHMI, N.; KARTHIK GANESH, M.; GANESH, L. E PRAKASH, S. Effect of *Mucuna pruriens* (Linn.) on mitochondrial dysfunction and DNA damage in epididymal sperm of streptozotocin induced diabetic rat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 145 (1): 32-41, **2013**

TSAI, B. Y.; WEST, J. E VAN GUNDY, S. D. E. A. Screening plants for nematicidal agents. *Phytochemical Pesticides*, v. 11, p 1-26, **1991**

WILLIAMSON, V. M. E GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6 (4), p 327-333, **2003**