

JÚLIO CÉSAR TEIXEIRA DA SILVA

**ISOLAMENTO DE TETRANORTRITERPENÓIDES DE
SEMENTES DE *Azadirachta indica* (Nim) E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE NEMATICIDA SOBRE *Heterodera
glycines***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

DEDICO, aos meus pais João Batista e Eva Maria, que venceram dificuldades e obstáculos monumentais, para que eu tivesse uma educação singular e exemplar.

OFEREÇO, a todos **amigos**, que de uma forma ou outra, muito contribuíram para a realização desse sonho, em especial aos meus irmãos Deivid, Juninho, Teca, Meire, Tia Sandra, Eduardo Rezende (Técnico do laboratório LPPN-UFV).

AGRADECIMENTOS

Ao BOM DEUS por ter me concedido mais essa vitória em minha vida;

À Universidade Federal de Viçosa – UFV – MG, por intermédio dos Departamentos de Química e Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro oferecido durante toda a execução do projeto proposto;

Ao Prof. Ph.D. Gulab Newandram Jham e sua esposa Alice Jham, pela incansável e exaustiva dedicação e orientação, pela relação carinhosa adquirida durante todo o período de convívio.

Ao técnico Eduardo Rezende, pelo apoio e incentivo constantes, pela paciência e criatividade nos ensinamentos pertinentes ao laboratório, pela contribuição ímpar à minha formação profissional e humana e finalmente pelo companheirismo em todas as horas de nosso convívio diário.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química, em especial à professora Elita Duarte pelo carinho e apoio em todos os momentos de minha vida acadêmica, aos professores José Roberto e Cláudio Lima, ao técnico José Luiz (LASA-UFV) pelos bons conselhos e ensinamentos transmitidos.

Aos conselheiros Élon Santiago Alvarenga e Rosângela D'arc de Lima Oliveira, pelas sugestões decisivas e valiosas no momento certo.

Ao amigo, estudante de agronomia, Naylor Daniel da Costa Aguiar, pela contribuição singular durante toda a execução dos ensaios biológicos em laboratório e casa de vegetação e principalmente pela conduta inteligente durante a interpretação dos resultados obtidos.

À amiga Sheila Mourão pelos trabalhos realizados, pelo companheirismo e pelo nosso amor em comum pela “árvore da vida”.

Ao Sr. Noemi, um herói em prol das causas do nim, pelo apoio incondicional através de doação de material para realização de parte do experimento, também pelo carinho, amor e afeto dedicado à minha pessoa.

Aos amigos Sueli e Victor, proprietários da BIONIM, pela notável contribuição através de trocas de experiências e conhecimentos sobre o nim.

Aos amigos do laboratório de Solos e Matéria Orgânica (UFV), em especial ao Sr. Braz pelo carinho e auxílio no uso do SpeedVac.

A todos os meus tios e tias, em especial, Tia Sandra, Dalva, Ana, Neném e Geraldo, Nizete, Tia Margarida (in memorium), Tio Cesarino, Geraldo, João (in memorium), Clair, Nego e a todos outros que de uma forma ou outra contribuíram para que eu adquirisse forças e prosseguisse até o final.

Aos meus primos Eder, Nívea, Juliana, Elis, Marcelo, Nielsen (in memorium), Luzia, Ana Lúcia, Gisele, Suelen e todos os outros que fazem parte da minha história de vida.

Ao meu amigo incondicional, companheiro de todas as horas, Wallace Ernesto Sant'Anna Ramos e a sua família querida, Bigode, Ângela e Anelise (irmã) por todo amor e carinho concebidos a mim durante todo o meu período na UFV.

À amiga de todas as horas, Letúzia, pelo apoio, carinho, dedicação e por todos os momentos inesquecíveis vividos em Viçosa.

À uma família modelo, que muito contribuiu para minha formação como ser humano honesto, amável e temente a Deus. Vera, Joel, Joelma e Tereza, estendo essa vitória à vocês.

Aos amigos e colegas da graduação e pós-graduação em especial, Sarita, Cristiane, Raquel, Mônica, Vespa, Carol, Marcelo, Kelly, Wanessa Arruda, Adriana, Pedro, Bruna, Fernanda e Meire.

À secretária da pós-graduação, Marisa, pelo pronto atendimento, ajuda e principalmente pelo carinho e dedicação em todos os momentos.

Aos eternos amigos moradores do alojamento posinho 1712, Flávio (Sapo), Jovane, Ozzi, Jarbas (Passarinho), Alexandre (Boy), Condé, Fabiano (Pomba), Renan (Mindim), Weldon (Baiano).

Aos amigos companheiros da república triptofano (Clélia Bernardes), Walber, Vinícius, Waldimir (Canário), Felipe (Jiló), Deivid (irmão), Felipe (primo do Vinícius), Douglas, Daniel, Ewerton e a todos os amigos da república, em especial, Valesca, Michele, Marie, Tássia, Freddy, Sr. João e Sra. Sônia (pais do Vinícius).

Aos amigos de infância Antônio Marcos, Maicon, Marcinho, Teófilo, Marcelo (nonó), Mariza Alves, Mônica, Marineide (Teca), Tatiane, Charlane, Leiliane, Cheila e madrinha Rosilene.

À todos amigos da FUNCIME e GUARDA-MIRIM de Caratinga-MG, em especial ao comandante Sebastião Fausto da Silva.

À Dona Alzira e Dr. Wilson Damião (in memorium) pelo carinho, ensinamentos, incentivo e apoio incondicional.

A todos os meus familiares, minha avó Nilza, meu avô Cezarino, meu pai João Batista e Eva Maria, meus irmãos Juninho e Deivid, pelo amor, carinho, apoio, respeito e incentivo.

Enfim, a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
ARTIGO 1 - ISOLATION OF AZADIRACHTIN A FROM NEEM (<i>Azadirachta indica</i>) SEED CONCENTRATE BY COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY FOLLOWED BY PREPARATIVE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.....	13
ABSTRACT	13
1. INTRODUCTION	14
2. MATERIAL AND METHODS	14
2.1. Solvents and reagents	14
2.2. Extraction of aza-A	14
2.3. Solvent settling times and partition coefficient of aza-A 60 components ..	15
2.4. Countercurrent chromatography	16
2.5. Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) to isolate aza-A	16
2.6. ¹³ C NMR	17
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	17
4. CONCLUSIONS	19
ACKNOWLEDGEMENTS	19
REFERENCES	20
FIGURE 1	21

ARTIGO 2 - ISOLATION OF MINOR TETRANORTRITERPENOIDS FROM NEEM (<i>Azadirachta indica</i> A. JUSS) SEED CONCENTRATE BY COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY FOLLOWED BY PREPARATIVE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	22
ABSTRACT	22
INTRODUCTION	23
EXPERIMENTAL	23
Solvents and reagents	23
Extraction of tetranortriterpenoids	24
Solvent settling times and partition coefficient of aza-A 60 components	24
Countercurrent chromatography	25
Semi-preparative and analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) to isolate the six tetranortriterpenoids	25
¹³ C NMR	26
RESULTS AND DISCUSSION	26
CONCLUSIONS.....	28
ACKNOWLEDGEMENTS	28
REFERENCES	29
FIGURE 1	31
FIGURE 2	31
FIGURE 3	32
CAPÍTULO - EFEITO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS BRUTOS E COMPOSTOS PUROS, ISOLADOS DE SEMENTES DE NIM (<i>Azadirachta indica</i>) SOBRE <i>Heterodera glycines</i>	33
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Metodologia Geral	35
2.1.1. Obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i> ..	35
2.1.2. Preparo dos extratos brutos de Nim	35
2.1.3. Obtenção do extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60)	37

2.1.4. Isolamento dos triterpenóides a partir de extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60)	37
2.1.5. Análise estatística	37
2.2. Efeito <i>in vitro</i> dos extratos brutos de sementes de nim na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i>	38
2.3. Avaliação do desenvolvimento de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i> , em soja, após tratamento com extratos brutos de nim	38
2.4. Efeito do extrato de Aza-A 60 na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines in vitro</i>	39
2.5. Avaliação da mortalidade, <i>in vitro</i> , de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i> tratados com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60.....	39
2.6. Avaliação do desenvolvimento de <i>Heterodera glycines</i> , em soja, após tratamento com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60	40
2.7. Efeito de triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60 na eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i>	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1. Efeito <i>in vitro</i> dos extratos brutos de sementes de nim na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i>	42
3.2. Avaliação do desenvolvimento de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i> , em soja, após tratamento com extratos brutos de nim	44
3.3. Efeito do extrato de Aza-A 60 na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines in vitro</i>	45
3.4. Avaliação da mortalidade, <i>in vitro</i> , de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i> tratados com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60.....	47
3.5. Avaliação do desenvolvimento de <i>Heterodera glycines</i> , em soja, após tratamento com triterpenóides puros isolados do extrato de Aza-A 60.....	49
3.6. Efeito de triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60 na eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Heterodera glycines</i>	50
4. CONCLUSÕES	53

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
6. CONCLUSÕES GERAIS	59
ANEXOS	61

RESUMO

SILVA, Júlio César Teixeira, MS., Universidade Federal de Viçosa, Janeiro de 2005.
Isolamento de tetranortriterpenóides de sementes de *Azadirachta indica* (Nim) e avaliação da atividade nematicida sobre *Heterodera glycines*. Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Rosângela D'arc de Lima Oliveira e Elson Santiago de Alvarenga.

Os extratos brutos de nim foram preparados a partir de sementes extraídas seqüencialmente com hexano, metanol e água. O extrato metanólico foi particionado com acetato de etila e água seguido por tratamento com carvão ativo, repetindo-se 3 vezes e obtendo-se o extrato concentrado enriquecido com 60% de azadiractina A (Aza-A 60). Primeiramente, isolou-se azadiractina A através da injeção de 700 mg de Aza-A 60 no cromatógrafo em contracorrente (CCC), com coluna de politetrafluoretileno e 116mL de capacidade, utilizando-se o sistema bifásico hexano:butanol:metanol:água (1:0.9:1:0.9, v/v) eluído a 2mL/min, na direção cabeça-cauda. Coletaram-se 30 frações recuperando-se 95% do material injetado. Após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) usando-se tolueno:acetato de etila:metanol (10:1:2, v/v/v) como sistema eluente, as frações (9-13) foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) preparativa, utilizando-se uma coluna LC-8 (250 x 21 mm di, 5 µm) e metanol:água (50:50 v/v) a 6mL/min, sendo os efluentes monitorados num comprimento de onda de 217 nm. Assim, obteve-se Aza-A com 96% de pureza, segundo CLAE-FR analítica e sua estrutura foi confirmada por RMN ¹³C. Num segundo estudo foram isolados azadiractina B (Aza-B), azadiractina H (Aza-H), desacetilnimbim (Dnim), desacetilsalanim (Dsal), nimbim (Nim) e salanim (Sal) injetando-se 4.2 g de Aza-A 60 (700 mg/corrída) no CCC seguindo as mesmas condições relatadas no isolamento de Aza-A. Após as 6 injeções, obtiveram-se duas frações principais que foram reunidas após monitoramento por (CCD), havendo recuperação de 97% do material injetado. A primeira delas, correspondendo à soma das frações (9-13) de cada injeção, foi purificada por CLAE-FR preparativa nas mesmas condições do isolamento de Aza-A, obtendo-se Aza-B e Aza-H, ambas com 97% de pureza, segundo análises por CLAE. A segunda fração, referente à soma das frações (17-30) de cada injeção, foi purificada utilizando-se metanol:água (60:40 v/v) a 8

mL/min, obtendo-se Dnim, Dsal, Nim e Sal, todos 97% puros após análises por CLAE analítica, sendo todas estruturas confirmadas por RMN ¹³C. Todos os compostos purificados bem como extratos brutos de sementes de nim foram submetidos a ensaios de atividade nematicida sobre *Heterodera glycines*. Avaliando-se a mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2), seguindo a metodologia do tubo invertido, verificou-se que ocorreu menor recuperação (P 0,05) dos J2 tratados com os extratos brutos aquoso (1/2 e 1/10 v/v) e metanólico (1000 ppm), sendo que o extrato hexânico não apresentou efeito nematicida. A atividade dos extratos brutos aquoso e metanólico foi atribuída, respectivamente, à presença de saponinas e triterpenóides (limonóides). Nos ensaios em casa de vegetação, plantas de soja inoculadas com juvenis tratados com os extratos aquoso (1/2 e 1/10 v/v) ou metanólico (1000 ppm) produziram menos fêmeas e ovos (P 0,05), se comparada à testemunha. O extrato de Aza-A 60 (70 ppm) causou maior imobilidade (P 0,05) dos J2 (92%), sendo esta proporcional às concentrações estudadas. A mortalidade dos J2 foi avaliada para todos os triterpenóides isolados nas concentrações de 0,8, 8 e 80 ppm, havendo redução do número de J2 recuperados com aumento das dosagens aplicadas. Nim e Sal a 80 ppm foram os mais efetivos causando 99% de mortalidade. Plantas de soja inoculadas com J2 tratados com os triterpenóides a 80 ppm apresentaram um efeito nematicida médio de 95% na redução do número de fêmeas e ovos (P 0,05), se comparados à testemunha. Com relação à eclosão dos ovos, os triterpenóides testados a 100 ppm apresentaram uma atividade ovicida média (P 0,05) de 50 %, em relação à testemunha, e não se observou ação nematostática até 96 horas após o tratamento.

ABSTRACT

SILVA, Júlio César Teixeira, MS., Universidade Federal de Viçosa, January, 2005.
Isolation of tetranortriterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds and nematicidal activity evaluation against *Heterodera glycines*. Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee members: Rosângela D'arc de Lima Oliveira and Elson Santiago de Alvarenga.

Crude extracts were prepared from Neem seeds by sequential extraction with n-hexane, methanol and water. The methanolic extract was partitioned three times between ethyl acetate and water and treated with activated charcoal to obtain a concentrate (Aza-A 60) containing 60% azadirachtin A (aza-A). In the first study, aza-A (the major triterpenoid) was isolated by countercurrent chromatography (CCC) fitted with polytetrafluoroethylene coil (116 mL volume) using the biphasic solvent system n-hexane:butanol:methanol:water (1:0.9:1:0.9, v/v) by injecting 700 mg of Aza-A 60 and eluting with 2 mL/min, in the head to tail direction. Thirty fractions (3 mL each) were collected with 95% of the material being recovered. After monitoring by thin-layer chromatography (TLC) using toluene:ethyl acetate:methanol (10:1:2, v/v) as the developing solvent, the fractions (9-13) were purified by preparative reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using the LC-8 stainless-steel column (5 μ m, 250 x 21 mm id, Supelco) and methanol:water (50:50 v/v) as eluent at a flow rate of 6 mL/min. The effluents were monitored at 217 nm. Aza-A thus obtained was about 96% pure according to HPLC analysis. The structure of aza-A was confirmed by NMR (13 C). In the second study, six minor triterpenoids, i.e., azadirachtin B (aza-B), azadirachtin H (aza-H), desacetylnimbin (Dnim), desacetylsalannin (Dsal), nimbin (Nim) and salannin (Sal) were isolated by injecting 4.2 g of Aza-A 60 (700 mg/run) in CCC, using the same conditions as described for the isolation of aza-A. After the six injections, two main fractions were obtained and monitored by TLC with 97% of the injected material being recovered. The first fractions (9-13) were purified by RP-HPLC as described above to obtain aza-B and aza-H, both 97% pure as attested by analytical HPLC. The second fraction (17-30) was purified using methanol:water (60:40 v/v) at a flow rate of 8 mL/min, with dnm, dsal, nim and sal being obtained (each 97% pure) according to HPLC analysis and their structures being confirmed by NMR (13 C). The

nematicidal activity against *Heterodera glycines* of all the above-purified compounds and crude extracts was evaluated. The mobility of the second stage juveniles (J2) was evaluated by the inverted tube methodology. A smaller recovery (P 0.05) of J2 treated with the aqueous crude (1/2 and 1/10 v/v) and methanolic (1000 ppm) extract was obtained while the hexane extract did not present activity. The activity of the aqueous crude and methanolic extracts was likely due to the presence of saponins and triterpenoids (limonoids), respectively. In the greenhouse assay, soy plants inoculated with juveniles treated with the aqueous (1/2 and 1/10 v/v) or methanolic (1000 ppm) extract produced less females and eggs (P 0,05) as compared to the control. The extract Aza-A 60 (70 ppm) caused larger immobility (P 0,05) of J2 (92%), proportional to the studied concentrations. The mortality of J2 for all the isolated triterpenoids at concentrations of 0.8, 8 and 80 ppm was evaluated with a reduction in the number of the J2 recovered, observed with increase of the applied dosages. Nim and Sal at 80 ppm were the most effective causing 99% mortality. Soy plants inoculated with J2 treated with the triterpenoids at 80 ppm presented medium nematicidal effect of 95%, reducing the number of females and eggs (P 0,05) as compared to the control. In regard to egg hatching, the triterpenoids tested at 100 ppm showed medium ovicide activity (P 0,05) of 50% as compared to the control with no nematostatic activity being observed 96 h after treatment.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das principais commodities mundiais e seu preço é determinado pela negociação do grão nas principais bolsas de mercadoria, movimentando aproximadamente US\$ 215 bilhões/ano (EMBRAPA, 2004). Devido às suas variadas aplicações, possui demanda de consumo mundial superior a 180 milhões de toneladas. Os Estados Unidos ocupam a primeira posição entre os países produtores, respondendo segundo recente estimativa por 84,6 milhões de toneladas (USDA, 2004), seguido pelo Brasil que deverá ultrapassar a marca de 60 milhões de toneladas de grãos de acordo com a safra estimada para 2004/2005 (CONAB e IBGE, 2004). O complexo agroindustrial da soja (grão, farelo e óleo) é um dos principais setores na pauta de exportações brasileiras, sendo de extrema importância na geração de divisas para o Brasil, levando a lucros de quase trinta bilhões de dólares por ano à receita nacional (CONAB, 2004).

A cultura de soja está sujeita ao ataque de diferentes tipos de pragas durante o seu ciclo, o que pode acarretar grandes perdas devido ao sistema de monocultivo adotado para a sua produção. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides já foram detectadas no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2004). Os organismos que afetam o sistema radicular das plantas, como os fungos de solo, *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina*, e os fitonematóides são considerados os de maior importância na produção da soja na atualidade (SILVA, 1998). Os fitonematóides dos gêneros *Meloidogyne* Goeldi, 1887, conhecidos como nematóides das galhas e o nematóide de cistos da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, são considerados os de maior importância para a cultura (DIAS *et al.*, 2000a).

O nematóide de cistos da soja (NCS) foi detectado, pela primeira vez no Brasil, na safra 91/92 e atualmente já está presente em mais de 100 municípios, em sete Estados brasileiros, sendo que a cada safra, novos municípios são acrescentados à lista daqueles já atingidos (SILVA *et al.*, 1997; EMBRAPA SOJA, 2004). Trata-se de uma praga extremamente prejudicial à cultura da soja sendo que seu ataque limita o potencial de produtividade e a expansão de áreas plantadas no Brasil e no mundo (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2002). Perdas com rendimento em torno de 30 a 80% são normalmente

observadas em áreas com elevado grau de infestação por este nematóide, podendo ocasionar em alguns casos a completa destruição da lavoura (SILVA, 1999).

Os métodos de controle dos nematóides formadores de cistos comumente se baseiam no uso de cultivares resistentes, na rotação de culturas com o uso de plantas resistentes ou antagônicas e no controle químico convencional (LORDELO, 1984). Outras técnicas como o controle biológico utilizando microorganismos antagonistas, tais como fungos e seus metabólitos secundários (ALMEIDA, 1998; NITAO *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; MIZOBUTSI *et al.*, 2000), vêm sendo estudadas pelo seu potencial mas ainda não são usadas na prática. Todas essas técnicas apresentam algumas limitações ou restrições e dessa forma o manejo pode-se mostrar pouco efetivo (CERVIGNI, 2003).

A crescente demanda do mercado nacional e internacional por alimentos isentos de resíduos oriundos de defensivos sintéticos e o desenvolvimento de resistência por inúmeros patógenos, têm alterado o comportamento de produtores na busca de novas formas eficientes de produção, com baixo custo e menos agressivas ao meio ambiente. Segundo ISMAN (2000), os produtos naturais extraídos de plantas têm se apresentado como uma fonte alternativa de compostos a serem empregados no controle de pragas. Variadas substâncias com efeito nematicida têm sido detectadas em extratos de diversas espécies vegetais (KHURMA e SINGH, 1997; DIAS *et al.*, 2000b; OKA *et al.*, 2000).

O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), uma meliácea de origem asiática, vem sendo estudada extensivamente desde o isolamento em 1968, a partir de sementes, de seu principal composto, a Azadiractina (Figura 1A - Anexos), como um potente inseticida natural (BUTTERWORTH e MORGAN, 1968, 1972, citado por JARVIS *et al.*, 1999). Hoje é uma das espécies vegetais mais pesquisadas no mundo devido às suas propriedades singulares e reconhecida ação sobre mais de 400 espécies de pragas (MARTINEZ, 2002).

Já foram isolados de folhas, galhos, frutos e sementes mais de 300 compostos com ação pesticida comprovada, sendo a maioria destes pertencentes à classe dos tetranortriterpenóides (limonóides) (Figura 1 (A-G) - Anexos) (GOVINDACHARI *et al.*, 1990; 1991; 1992a; 1997; 1999 a,b,c; KUMAR *et al.*, 1996; KABALEESWARAN *et al.*, 1999; SCHAAF *et al.*, 2000; SIDDIQUI *et al.*, 2000a; 2000b; 2002; HALLUR *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2003), contudo, são nas sementes que se encontra a maior concentração dessas substâncias (MARTINEZ, 2002).

Diversas formulações comerciais derivadas da árvore de nim, além de óleo, torta e extratos brutos obtidos a partir de várias partes da planta, já foram utilizados com

sucesso no controle, *in vitro* e *in vivo*, de nematóides em diversas culturas (AKHTAR *et al.*, 1993; 1994; 1996; 1997; 1998; 2000a; 2000b; VYAS, 1993; REDDY *et al.*, 1996; RAO *et al.*, 1997; KHURMA e SINGH, 1997; MOJUMDER *et al.*, 1999; MUSABYIMANA *et al.*, 1999; 2000; DEBANAND *et al.*, 2000; NAGESH *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001). Entretanto, existem poucos relatos na literatura sobre a atividade das substâncias isoladas de nim (WILPS *et al.*, 1993; GOVINDACHARI *et al.*, 1995; 1998; SHARMA *et al.*, 2003), já que por se tratar de compostos polares e complexos, torna-se difícil separá-los em quantidades suficientes para sua utilização prática.

Existem várias técnicas para separação e purificação dos triterpenóides em sementes de nim, como: coluna cromatográfica aberta recheada com Florex RXM e eluição sob ação gravitacional (JOHNSON e MORGAN, 1997), coluna “flash” de sílica gel (YAMASAKI *et al.*, 1986), coluna “flash” com fase estacionária especial (Biotage) (JARVIS *et al.*, 1999), extração em fluido supercrítico (TONTHUBTHIMTHONG *et al.*, 2001), cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa preparativa (CLAEFR) (Govindachari *et al.*, 1990, 1991, 1992b, 1997; SUNDARAM e CURRY, 1993; KUMAR *et al.*, 1996), cromatografia líquida de fase reversa à média pressão (CLMP)(SHARMA *et al.*, 2003), dentre outras. Todas as técnicas citadas apresentam algumas desvantagens, tais como: consumo elevado de solventes orgânicos, gerando resíduos tóxicos e elevando o custo das análises; gasto de tempo excessivo na preparação das amostras e eluição dos compostos; perda de material por decomposição e adsorção irreversível de algumas substâncias nas fases estacionárias das colunas; necessidade de etapas de recristalização para obtenção dos triterpenóides puros, entre outras. Dessa forma, novas técnicas de purificação dos componentes de nim devem ser elaboradas de modo a atenuar os inconvenientes gerados pelas metodologias convencionais.

A cromatografia em contracorrente (CCC) consiste em isolar compostos através da partição da amostra em um sistema bifásico de solventes, no qual tanto a fase móvel quanto a estacionária são líquidas (OKA *et al.*, 1998). Por ser uma técnica suave, permite recuperação quantitativa da amostra aplicada (SILVA *et al.*, 2004; SILVA e JHAM, 2004) e sua utilização na purificação preparativa de produtos naturais é continuamente crescente, já que a quantidade de amostra analisada por corrida pode variar de mg a gramas (DU *et al.*, 2003).

Objetivou-se nesse trabalho:

1. Isolar Azadiractina A, constituinte encontrado em maior quantidade no extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60), por cromatografia em contracorrente (CCC) seguida por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa preparativa (CLAE-FR).
2. Isolar e purificar tetranortriterpenóides presentes em menores quantidades no extrato de Aza-A 60, por cromatografia em contracorrente (CCC) seguida por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa preparativa (CLAE-FR).
3. Avaliar a atividade de extratos brutos e compostos puros isolados de sementes de nim, sobre o nematóide do cisto da soja, *Heterodera glycines*.

Nota: * Os artigos um e dois que compõem esta tese são apresentados segundo as normas estabelecidas pelos periódicos Journal of Chromatography A e Phytochemical Analysis, respectivamente.

* As estruturas e os dados nos anexos referentes aos dois artigos que compõem esta tese, não foram enviados para os respectivos periódicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M. e MAHMOOD, I. Effect of *monochus aquaticus* and organic amendments on *Meloidogyne incognita* development on chilli. **Nematologia Mediterranea**, v.21, p.251-252, 1993.
- AKHTAR, M. e MAHMOOD, I. Control of root-knot nematode by bare-root dip in undecomposed and decomposed extracts of neem cake and leaf. **Nematologia Mediterranea**, v.22, p.55-57, 1994.
- AKHTAR, M. e MAHMOOD, I. Effect of a plant based product-nimin and some plant oils on nematodes. **Nematologia Mediterranea**, v.24, p.3-5, 1996.
- AKHTAR, M. e MAHMOOD, I. Impact of organic and inorganic management and plant-based products on plant-parasitic and microbivorous nematode communities. **Nematologia Mediterranea**, v.25, p.21-23, 1997.
- AKHTAR, M. Biological control of plant-parasitic nematodes by neem products in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, v.7, p.219-223, 1998.
- AKHTAR, M. e AKHTAR, M. Evaluation of the nematicidal effects of a neem-based product against root-knot nematode on tomato. **International Pest Control**, v.42, n.1, p.16-17, 2000a.
- AKHTAR, M. e AKHTAR, M. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). **Integrated Pest Management Reviews**, v.5, n.1, p.57-66, 2000b.
- ALMEIDA, A.R., COSTA, M.J.N., CAMPOS, V.P. Avaliação do crescimento e esporulação de fungos antagonistas de nematóides, e efeito do filtrado desses fungos sobre a eclosão de juvenis do segundo estágio de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia**, XXI, 1998. Maringá-PR, anais, p.58-59.

- CERVIGNI, G.D.L. **Análise genômica da resistência às raças 3 e 9 do nematóide do cisto e avaliação da variabilidade genética de caracteres agronômicos em soja.** 2003. 82p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa -MG.
- CHEN, S.Y., DICKSON, D.W., MITCHELL, D.J. Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. **Journal of Nematology**, v.32, p.190-197, 2000.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) – **Avaliação da Safra Agrícola 2004/2005 – 1º Levantamento Outubro de 2004.** Brasília-DF, 2004. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 30 Nov. 2004.
- DEBANAND, D., PRABAL, S., SAIKIA, L., DAS, D., SAIKIA, P. Effect of certain plant extracts on rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. **Journal of the Agricultural Science**, v.13, n.1, p.85-87, 2000.
- DIAS, W.P., GARCIA, A., SILVA, J.F.V. Nematóides associados à cultura da soja. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia, XXII**, 2000a. Uberlândia-MG, anais, p.59-65.
- DIAS, C.R., SCHWAN, A.V., EZEQUIEL, D.P., SARMENTO, M.C., FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, v.24, p.203-210, 2000b.
- DU, Q., JERZ, G., WINTERHALTER, P. Separation of andrographolide and neoandrographolide from the leaves of *Andrographis paniculata* using high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.147-151, 2003.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro nacional de pesquisa de soja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Soja : dados econômicos – 2004.** Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 29 Nov. 2004.

EMBRAPA SOJA; **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil, 2005.** Londrina, PR, 2004, 239p.

GOVINDACHARI, T.R., SANDHYA G., GANESHRAJ, S.P. Simple method for the isolation of azadirachtin by preparative high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.513, p.389-391, 1990.

GOVINDACHARI, T.R., SANDHYA G., GANESHRAJ, S.P. Isolation of Novel Azadirachtins H and I by High-Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v.31, n.5/6, p.303-305, 1991.

GOVINDACHARI, T.R. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the Neem tree). **Current Science**, v.63, p.117-122, 1992a.

GOVINDACHARI, T.R., SANDHYA G., GANESHRAJ, S.P. Structure of azadirachtin K, a new tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*. **Indian Journal of Chemistry**, v.31, B, p.295-298, 1992b.

GOVINDACHARI, T.R., NARASIMHAN, N.S., SURESH, G., PARTHO, P.D., GOPALAKRISHNAN, G., KRISHNA KUMARI, G.N. Structure related insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, n.10, p.1585-1599, 1995.

GOVINDACHARI, T.R., GOPALAKRISHNAN, G. 13,14 – Desepoxyazadirachtin – A, a tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v.45, n.2, p.397-399, 1997.

GOVINDACHARI, T.R., SURESH, G., GOPALAKRISHNAN, G., BANUMATHY, B., MASILAMANI, S. Identification of antifungal compounds from seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**, v.26, n.2, p.109-116, 1998.

GOVINDACHARI, T.R., GOPALAKRISHNAN, G., MALATHI, R., PRADEEP SINGH, N.D. The 11 α -H and 11 β -H Epimers of Azadirachtin H. **Natural Product Letters**, v.13 n.3, p.157-162, 1999a.

- GOVINDACHARI, T.R., MALATHI, R., GOPALAKRISHNAN, G., SURESH, G., RAJAN, S.S. Isolation of a new tetranortriterpenoid from the uncrushed green leaves of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v.52, p.1117-1119, 1999b.
- GOVINDACHARI, T.R., GOPALAKRISHNAN, G., SURESH, G. Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels. **Fitoterapia**, v.70, p.558-560, 1999c.
- HALLUR, G., SIVRAMAKRISHNAN, A., BHAT, S.V. Three new tetranortriterpenoids from neem seed oil. **Journal of Natural Products**, v.65, n.8, p.1177-1179, 2002.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Levantamento Sistemático de Produção Agrícola (LSPA) – Dados de Previsão de Safra – Outubro 2004**. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf>>. Acesso em: 29 Nov. 2004.
- ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, p.603-608, 2000.
- JARVIS, A.P., MORGAN, E.D., EDWARDS, C. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. **Phytochemical Analysis**, v.10, p.39-43, 1999.
- JOHNSON, S. e MORGAN, E.D. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal of Chromatography A**, v.761, p.53-63, 1997.
- KABALEESWARAN, V., RAJAN, S.S., GOPALAKRISHNAN, G., GOVINDACHARI, T.R. Salannin and 3-desacetylsalannin. **Acta Crystallographica**, Section C, p.1952-1955, 1999.
- KHURMA, U.R e SINGH, A. Nematicidal potential of seed extracts: in vitro effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Mediterranea**, v.25, p.49-54, 1997.

- KUMAR, C.S.S.R., SRINIVAS, M., YAKKUNDI, S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v.43, n.2, p.451-455, 1996.
- LORDELO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8ª ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314p.
- MARTINEZ, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica*. Natureza, Usos Múltiplos, Produção**. Londrina : IAPAR, 2002. 142p.
- MIZOBUTSI, E.H., FERRAZ, S., RIBEIRO, R.C.F. Avaliação do parasitismo de diversos isolados fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p.167-172, 2000.
- MOJUMDER, V. Effect of seed treatment of chickpea with crude neem products and neem-based pesticides on nematode multiplication in soil and the grain yield. **International Journal of Nematology**, v.9, n.1, p.76-79, 1999.
- MUSABYIMANA, T., SAXENA, R.C. Efficacy of neem seed derivatives against nematodes affecting banana. **Phytoparasitica**, v.27, n.1, p.43-49, 1999.
- MUSABYIMANA, T., SAXENA, R.C., KAIRU, E.W., OGOL, C.K.P.O., KHAN, Z. Powdered neem seed and cake for management of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and parasitic nematodes. **Phytoparasitica**, v.28, n.4, p.321-330, 2000.
- NAGESH, M., REDDY, P.P. Status of mushroom nematodes and their management in India. **Integrated Pest Management Reviews**, v.5, n.3, p.213-224, 2000.
- NITAO, J.K., MEYER, S.L.F., CHITWOOD, D.J. In vitro assays of *Meloidogne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. **Journal of Nematology**, v.31, p.172-183, 1999.
- OKA, H., HARADA, K., YTO, Y., ITO Y. Separation of antibiotics by counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.812, p.35-52, 1998.

- OKA, Y., NACAR, S., PUTIEVSKY, E., RAVID, U., YANIV, Z., SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v.90, n.7, p.710-715, 2000.
- RAO, M.S., REDDY, P.P., NAGESH, M. Effective use of neem cake extract for the management of root-knot nematodes infecting okra (*Abelmoschus exulentus*). **Pest management in horticultural ecosystems**, v.3, n.2, p.95-99, 1997.
- REDDY, P.P., RAO, M.S., NAGESH, M. Management of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. **Nematologia Mediterranea**, v.24, p.265-267, 1996.
- RODRIGUES, A.C., JHAM, G.N., OLIVEIRA, R.D. Mortality of the soybean cyst nematode in aqueous extracts of neem plant. **Nematologia Mediterranea**, v.29, p.173-175, 2001.
- SANTOS JÚNIOR, R.F., SANTOS, J.M., RUDORFF, B.F.T., MARCHIORATO, I.A. Detecção de *Heterodera glycines* em plantio de soja mediante espectrorradiometria no visível e infravermelho próximo. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.4, p.356-360, 2002.
- SHARMA, V., WALIA, S., KUMAR, J., NAIR, M.G., PARMAR, B.S. An efficient method for the purification and characterization of nematicidal Azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3966-3972, 2003.
- SCHAAF, O., JARVIS, A.P., VAN DER ESCH, A., GIAGNACOVO, G., OLDHAM, N.J. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.886, p.89-97, 2000.
- SIDDIQUI, B.S., RASHEED, M., GHIASUDDIN, FAIZI, S., NAQVI, S.N.H., TARIQ, R.M. Biologically active triterpenoids of biogenetic interest from the fresh fruit coats of *Azadirachta indica*. **Tetrahedron**, v.56, p.3547-3551, 2000a.

SIDDIQUI, B.S, AFSHAN, F., GUIASUDDIN, FAIZI, S., NAQVI, S.N.H., TARIQ, R.M. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v.53, p.371-376, 2000b.

SIDDIQUI, B.S., AFSHAN, F., FAIZI, S., NAQVI, S.N.H., TARIQ, R.M. Two new triterpenoids from *Azadirachta indica* and their insecticidal activity. **Journal of Natural Products**, v.65, n.8, p.1216-1218, 2002.

SILVA, J.F.V e GARCIA, A. Nematóide de cisto da soja: Situação atual e perspectivas. In: **I Encontro Regional sobre nematóide de Cisto da Soja -1996, Chapadão do Sul, MS**. Resumos. p.13-18. Dourados: EMBRAPA-CPAO/SEIVA, 1997. 31p. (EMBRAPA-CPAO. Documento, 12).

SILVA, J.F.V. Problemas sanitários da soja no Brasil com ênfase em fitonematóides. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia XXI**, 1998. Maringá-PR, anais, p.16-20.

SILVA, J.F.V. Um Histórico. In: Artsigner (Eds). **O nematóide do cisto da soja: A experiência brasileira/SBN- Sociedade Brasileira de Nematologia**. Jaboticabal : SBN, 1999. cap.1, p.15-24.

SILVA, J.C.T., JHAM, G.N., OLIVEIRA, R.D.L., BROWN, L. Isolation of Azadirachtin A from Neem (*Azadirachta indica*) seed concentrate by counter-current chromatography followed by preparative high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, submetido em 2004a.

SILVA, J.C.T. e JHAM, G.N. Isolation of Six Minor Tetranortriterpenoids from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Seed Concentrate by Counter-current Chromatography Followed by Preparative High Performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis** , submetido em 2004b.

SUNDARAM, K.M.S e CURRY, J. High performance liquid chromatography determination of Azadirachtin in conifer and deciduous foliage, forest soils, leaf litter and stream water. **Journal of Liquid Chromatography**, v.16, n.15, p.3275-3290, 1993.

TONTHUBTHIMTHONG, P., CHUAPRASERT, S., DOUGLAS, P., LUEWISUTTHICHAT, W. Supercritical CO₂ extraction of nimbin from neem seeds – an experimental study. **Journal of Food Engineering**, v.47, p.289-293, 2001.

USDA (United States Department of Agriculture). **Economic Research Service. Data products. Washington, 2004.** Disponível em <http://www.ers.usda.gov/data/sdp>. Acesso em 30 Nov. 2004.

VYAS, S.C. Effect of neem cake, neem oil, repelin and carbofuran on control of soybean nematodes. *In: Nim and environment*. SINGH, R.P., CHARI, M.S., RAHEJA, A.K., KRAUS, W. (Eds). New Delhi : Oxford and IBH Publishing Co., 1993. cap.71, p.663-667.

WILPS, H., NASSEH, O., KRALL, S. The effects of various neem formulations on mortality rate and morphogenetic defects upon *Schistocerca gregaria* (Forsk.) Larvae. *In: Neem and environment*. SINGH, R.P.; CHARI, M.S.; RAHEJA, A.K., KRAUS, W. (Eds). New Delhi : Oxford and IBH Publishing Co., 1993. cap.24, p.221-236.

YAMASAKI, R., KLOCKE, J.A., LEE, S.M., STONE, G.A., DARLINGTON, M.V. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.356, p.220-226, 1986.

Isolation of Azadirachtin A from Neem (*Azadirachta indica*) seed concentrate by countercurrent chromatography followed by preparative high performance liquid chromatography

J.C.T. Silva ^a, G. N. Jham ^{a,*}; Rosângela D'arc de L. Oliveira ^b and L.Brown ^c

^aDepartamento de Química, ^bDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Brazil

^cAECS, P.O. Box 80, Brigend, S. Wales, UK, CF31 4XZ

Abstract

Countercurrent chromatography (CCC) followed by preparative high performance liquid chromatography (HPLC) was successfully used to isolate the major bioactive component azadirachtin (aza-A), from the seed concentrate of the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss), (aza-A 60). Reproducible, narrow polarity range were obtained from repeated 700 mg loadings per injection, of aza-A 60, onto a relatively small volume (116 ml) CCC coil. The CCC preparation time of 45 minutes and total solvent usage of approximately 200ml, represent major savings in time and cost, compared to literature based open tubular and Flash Chromatography published techniques. Of even greater significance is that a mass balance of injected mass to recovered mass, showed that approximately 95% of the material injected was recovered. Preparative reverse phase HPLC was used to purify these extracts to isolate aza-A (approximately 96% pure) as determined by analytical HPLC. The structure of aza-A was confirmed by ¹³C-NMR.

Keywords: Neem; Isolation; Azadirachtin A; Countercurrent chromatography; Preparative high performance liquid chromatography.

* Corresponding author. E-mail: gulab@ufv.br, Phone: +31 38993071; FAX: +3138993065

1. Introduction

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) tree has attracted worldwide attention due to its activity against 400 insect pests (1-3). More than 300 compounds have been characterized from Neem seed, one-third of which are tetranortriterpenoids (limonoids) [1]. Azadirachtin A (aza-A) (Figure 1 A – Anexos) is the major limonoid in the seeds reported to have anti-feed, growth disrupting, ovicidal activity etc. against a variety of insect pests [2, 4-13] besides being used to treat a variety of human ailments [3]. Separation of the Neem seeds' limonoids has been reported with HPLC [5-11, 14-17], flash chromatography [7], MPLC [13] etc. All these procedures are very time consuming and need large volumes of solvents and hence were not used in this study.

Countercurrent chromatography (CCC) is a liquid/liquid partition method that uses no solid support matrix. It is extensively utilized for the separation of gram quantities of plant natural products [4, 18-20] and recent unpublished research by an author suggests multiple tones per annum are now feasible by modular CCC. To date only one CCC study is reported in the literature for the separation of aza-A [4]. The authors were unable to replicate these results on the CCC equipment available to them.

In this study we report a new method to separate aza-A in Neem (*Azadirachta indica*) seed concentrate (aza-A 60) using CCC followed by preparative reverse phase HPLC.

2. Material and methods

2.1. Solvents and reagents

All solvents and chemical reagents were of analytical grade and were distilled before use. Water for chromatographic analyses was purified using MilliQ (Waters, USA) water purification system. The standards aza-A, aza-B, salannin (sal), desacetylsalannin (dsal), nimbin (nim), desacetylnimbin (dnim), were kindly donated by Dr. Gopalakrishnan (SPIC Science Foundation, Madras, India). Neem seeds were purchased from Bionim (Brazil).

2.2. Extraction of aza-A

The isolation of aza-A in Neem seeds was carried out by a modification of a method described in the literature [13]. Five hundred grams of ground Neem seed kernels were extracted with hexane (3x500 ml) with a magnetic stirrer for 8 h (after each solvent addition) at room temperature (25°C) and the oil obtained after vacuum

filtration was discarded. The residual de-fatted Neem cake was extracted with a magnetic stirrer for 8 h (after each solvent addition) at room temperature with methanol (5x500 ml) and the combined extracts were concentrated at 40°C in a rotatory evaporator (residue was discarded). The extract (62 g) was partitioned between hexane (300 ml) and 90% aqueous methanol (300 ml) and the hexane layer discarded. Methanol was evaporated at 40°C in a rotatory evaporator and the oil obtained was partitioned between water (500 ml) and ethyl acetate (500 ml). After discarding the aqueous phase, the organic phase was treated with activated charcoal (4.0 g at 60°C for 25 min), filtered and the solution concentrated at 30°C in a rotatory evaporator to obtain a viscous orange oil (9.0 g). The oil was dissolved in ethyl acetate (10 ml) and compounds precipitated with an excess of hexane to obtain a residue (7.7 g) containing ~20% aza-A [13]. The process of charcoal addition was repeated twice more to obtain 4.0 grams of a brownish white powder containing ~60% of azadirachtin A [13] (abbreviated as aza-A 60).

2.3. Solvent settling times and partition coefficient of components from aza-A 60

Settling times of fifteen biphasic solvent systems without and with aza-A 60 (20 mg), were determined by vigorously hand mixing (20 sec) 1 ml of each of the component solvents and noting the time necessary to obtain two distinct phases. The partition coefficient (K_D) of aza-A 60 components in the two phases of the fifteen solvents system were determined by silica gel TLC (20x20 cm) with toluene: ethyl acetate: methanol (10:1:2, v/v/v) as solvent and vanillin-sulfuric acid-ethanol (3g, 1.5 ml : 100 ml) as the developing reagent [7]. For the settling and partition experiments, 20 mg of aza-A 60 was dissolved in 4 ml of each of the fifteen solvents followed by vigorous hand mixing for 20 sec. The two phases were allowed to settle and for partition experiments, TLC was conducted with both the phases. After development with the spraying reagent, the partition coefficient (K_D) was determined qualitatively. The K_D was estimated from the formula: $K_D = [C]_{org} / [C]_{aqu}$ where K_D , $[C]_{org}$, and $[C]$ are the solute partition coefficient, concentration of the solute in the organic and aqueous phases, respectively. If the concentration of the solutes in both phases was approximately the same, K_D was defined as ~1 and if the concentration of the solutes was significantly higher concentration in the organic phases, K_D was defined as >1. From this data, the solvent system, i.e., settling time of about 30 seconds and K_D ~1 was n-hexane-n-butanol-methanol-water (1:1:1:1, v/v). This was further optimized and n-hexane-n-butanol-methanol-water (1:0.9:1:0.9, v/v) evaluated by instrumental CCC.

2.4. *Countercurrent chromatography*

An AECS (Bridgend, UK), CCC (Model : Quattro CCC MK 4 LabPrep) consisting of two PTFE coils (1.6 mm i.d./3.2 o.d.) one being preparative (116 ml) and the other analytical (26 ml), a HPLC pump (Shimadzu, Kyoto, Japan, model LC-6AD) a low-pressure injection valve and a PTFE 6-mL sample loop was used. This system was coupled to a fraction collector (Isco, USA, Model Foxy Jr.) programmed to collect 1.5 ml/min.

For CCC, appropriate volumes of solvents n-hexane-n-butanol:methanol:water (1:0.9:1:0.9, v/v) were vigorously hand mixed in a separating funnel for 10 min, transferred to a flask and allowed to sit overnight at room temperature. Next morning the solvents were degassed (ultrasonic) for 30 min and immediately used. Isocratic elution mode was conducted in head to tail manner with the upper organic phase as the stationary phase (reverse phase). The preparative column (116 ml) was entirely filled with the upper phase of solvent system and the system rotated at 800 rpm at 30°C followed by lower solvent phase pumping at a flow-rate of 2.0 ml/min. After attaining hydrodynamic equilibrium, 700 mg dissolved in a 1: 1 mixture upper and lower phases were injected. Thirty fractions (3 ml each) were collected in 45 min. The solvents were evaporated in a rotatory evaporator at 40°C followed complete drying at room temperature in a SpeedVac to obtain an off white powder. A mass histogram (absolute weights) against CCC fraction number was plotted. The major fractions (9-13) were analyzed by analytical HPLC using conditions described in the part 2.5 of the experimental section.

2.5. *Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) to isolate aza-A*

A liquid chromatograph (Shimadzu, Osaka, Japan, model LC-6AD), with the UV-VIS detector (Shimadzu, Osaka, Japan, model SP-10AVP with cell volumes of 7 and 20 μ L for analytical and preparative HPLC, respectively), data collection system (Shimadzu, Osaka, Japan, model class 5000) equipped with a Rheodyne injector was used for both analytical and preparative HPLC. For preparative HPLC, the LC-8 stainless-steel column (5 μ m, 250 x 21 mm id, Supelco) was used with a pre-column (5 μ m, 50 x 4.6 mm id, Supelco), which was hand filled with packing material LC-8 (5 μ m, Supelco). For analytical HPLC, a stainless-steel column (250 x 4.6 mm id, 5 μ m, Supelco) with a pre-column (20 x 4.6 mm id) containing the same material was used.

For preparative and analytical HPLC, injections were made through 1000 and 100 μL loops, respectively. Effluents were monitored at 217 nm. Isocratic elution was carried out with methanol:water (50:50, v/v) using flow-rates of 6.0 ml/min and 0.8 ml/min for the preparative and analytical modes, respectively.

The fractions (9-13) from CCC were purified by preparative RP-HPLC by injecting up to 50 mg of each of the above fractions. Appropriate fractions were collected, combined followed by evaporation of the solvents at room temperature in a SpeedVac to obtain an off white powder which was used for NMR studies.

2.6. ^{13}C NMR

The liquid state ^{13}C NMR spectra (75 MHz) were recorded on a Varian spectrometer (Palo Alto, California, USA, model Mercury 300). The samples were dissolved in deuterated chloroform and analyzed at room temperature. Acquisition conditions for aza-A were: pulse 45° , spectral width 18,867 Hz and acquisition time 1.643 sec with 10,000 repetitions.

3. Results and discussion

CCC has been extensively used to obtain gram quantities of pure natural products [4, 18-20] and appeared to be a viable alternative to purify Neem limonoids. Since little information [4] was available in the literature on the use of CCC to separate Neem seed limonoids, we conducted an extensive, systematic study of the biphasic solvent systems that could be used. Commonly used solvents, i.e., water, methanol, ethanol, i-propanol, ethylacetate, dichlorometane, petroleum ether, cyclohexane, chloroform and acetonitrile were evaluated. Out of the fifteen candidate biphasic solvent systems, thirteen were rejected as the settling times were too long, emulsions were formed or suitable partitioning did not occur. Thus, only the solvent systems, i.e., hexane:butanol/methanol:water and hexane:ethylacetate/acetonitrile:methanol:water seemed satisfactory since they had short settling times (~ 30 seconds) and K_D of ~ 1 . However, better CCC separation was achieved with the former solvent and hence was selected for further evaluation. The solvent system was further optimized and n-hexane-n-butanol-methanol-water (1:0.9:1:0.9) gave the best separation and hence finally chosen for instrumental evaluation.

The next step was to evaluate on the instrument whether reverse or normal phase CCC would be optimal. Normal phase did not provide the better separation. Reverse

phase was therefore chosen. Several parameters i.e., sample size injected, flow rates, reproducibility, volume of fractions collected, etc., were evaluated. Best separation was obtained with up to 700 mg of aza-A 60 injected with a flow rate of 2 ml/min, collection of 3 ml fractions, when utilizing a 116 ml PTFE coil of 1.6 mm bore, whilst rotating at 800 rpm. Under these conditions, the retention of the stationary phase in the CCC was 79%. We were unable to obtain an acceptable separation of aza-A 60 using conditions described in the literature [4]. It is possible that this could have been because of a variety of factors, which we have not yet determined. Mass balance allowed the determination of recovery efficiency. The mass amounts of each of the thirty fractions suggested 95% of the aza-A 60 was recovered. The majority of the compounds were present in fractions 9-13 (87% of the recovered) with the major being fraction 10 (Figure 2 - Anexos).

HPLC (preparative) analysis of aza-A 60 analysis showed the presence of seven limonoids, i.e., azadirachtin H, aza-A, aza-B, dnim, dsal, nim and sal (elution order) were identified using standards (Figure 3 - Anexos). These compounds have been previously reported in the literature with aza-A being the major component [11,12,13]. The relative retention times of the compounds corresponded to decreasing polarity being in agreement with literature [6,12,21,22].

HPLC (analytical) traces obtained on analysis of CCC obtained fractions 9-13 are presented in Figures 1A to 1E, respectively. As it can be seen, some of these fractions were relatively pure. For example, the fractions 9 and 10 (aza-A) were ~90 and 75% pure, respectively. The increase in the purity of aza-A obtained with CCC, in comparison with its initial % purity show clearly shows that the process was efficient. Since the CCC obtained fractions were relatively pure and in a relatively narrow polarity band, preparative HPLC due to its simplicity was chosen to purify the extracts further. Several solvent mixtures, sample size and flow rates were evaluated. Best resolution was obtained with 50% methanol-water, up to 50 mg injected, at a flow rate 6 ml/min. The purity of aza-A (110 mg) was ~ 96% as determined by HPLC (Figure 1F).

The structure of aza-A was confirmed by ¹³C NMR with the chemical shifts being in agreement with the literature values [12,21,22,23] (Table 1 e Figura 4 – Anexos).

There were major advantages, with liquid/liquid CCC, i.e., ease of use, speed, low solvent usage, quantitative recoveries etc over the other first stage solid/liquid chromatographic techniques for the separation of limonoids. The combined CCC/preparative HPLC now typically takes approximately 10-15 hours to achieve

significant quantities of aza-A at an approximate purity of 96%. It would take several weeks to obtain the same amounts by other chromatographic procedures, such as open column chromatography, flash chromatography, HPLC, MPLC etc [5-11, 13-17]. In our procedure, aza-A obtained after preparative HPLC purification of CCC fractions were almost analytically pure with no crystallization being necessary. Re-crystallization is a very inefficient procedure to purify organic compounds since high losses occur. In the literature procedure utilizing other chromatographic procedures [6, 22] it was necessary to purify compounds by crystallization. Another major advantage of CCC was that almost quantitative recoveries (95%) were obtained. Such recoveries with other types of chromatographic procedures (TLC, column chromatography etc.) are impossible to obtain. No quantitative data was reported on their pioneering CCC separation of aza-A [4].

4. Conclusions

Modern CCC instrumentation has been shown to offer a reproducible, rapid, low solvent cost alternative, to open tubular and Flash Chromatography procedures. The most significant advantage of CCC over the above solid / liquid chromatography (SLC) preparative techniques is, however, that an approximate mass balance of major and minor components was proven to occur. Mass balance is a rare occurrence in the purification of complex natural product extracts by SLC, but common in CCC. The narrow polarity range prepared by CCC, can be supplemented by preparative HPLC procedures, to achieve 96 % purity of aza-A. The described CCC/HPLC technique therefore offers significant advantages over the existing SLC literature methods. Our research group is now extending the CCC/HPLC procedure to separate minor components in aza-A 60.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Brazilian agencies (FAPEMIG and CNPq) for their financial support. Fellowships (JCTS and GNJ) from CNPq are also gratefully acknowledged.

References:

- [1] C.S.S.R. Kumar, M. Srinivas, S. Yakkundi, *Phytochemistry* 43 (1996) 451.
- [2] National Research Council. *Neem: a tree for solving global problems*, National Academy Press, Washington, DC, 1992.
- [3] G. Hallur, A. Sivramakrishnan, S.V. Bhat, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1177.
- [4] H.E. Hummel, D.F. Hein, Y. Ma, Y. Ito, E.F. Chou, *Med. Fac. Landbouww Univ. Gent* 62/2a (1997) 213.
- [5] R. Thejavathi, R.Y. Shirish, B. Ravindranath, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 374.
- [6] T.R. Govindachari, G. Suresh, G. Gopalakrishnan, *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 3465.
- [7] A.P. Jarvis, E. D. Morgan, C. Edwards, *Phytochem. Anal.* 10 (1999) 39.
- [8] T.R. Govindachari, G. Sandhya, S.P. Ganeshraj, *J. Chromatogr.* 513 (1990) 389.
- [9] D.R. Schroeder, K. Nakanishi, *J. Nat. Prod.* 50 (1987) 241.
- [10] E.C. Ubel, O.D. Warthen, M. Jacobson, *J. Liq. Chromatogr.* 2 (1979) 875.
- [11] T.R. Govindachari, G. Sandhya, S.P. Ganeshraj, *Chromatographia* 31 (1991) 303.
- [12] S. Barrek, O. Paise, M.F.G. Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 753.
- [13] V. Sharma, S. Walia, J. Kumar, M.G. Nair, B.S. Parmar, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3966.
- [14] B.C. Schiffers, A. Dieye, P. Ntema, B. Dieye, G. Ekukole, *Med. Fac. Landbouwk. Toeg. Biol. Wet. Univ. Gent* 62 (1997) 225.
- [15] J. Shaun, E. M. David, I.D. Wilson, M. Spraul, M. Hofmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1994) 1499.
- [16] J.H. Butterworth, E.D. Morgan, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1968) 23.
- [17] C.J. Hull, W.R. Dutton, B.S. Switzer, *J. Chromatogr.* 633 (1993) 300.
- [18] A. Berthod (Ed.), *Countercurrent Chromatography The Support-free Liquid Stationary Phase*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [19] Q. Du, Z. Li, Y. Ito, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 271.
- [20] X. Han, T. Zhang, Y. Wei, X. Cao, Y. Ito, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 237.
- [21] T.R. Govindachari, G. Sandhya, S.P. Ganeshraj, *Indian J. Chem.* 31B (1992) 295.
- [22] S. Johnson, E.D. Morgan, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 53.
- [23] T.R. Govindachari, G. Sandhya, S.P. Ganeshraj, *J. Nat. Prod.* 55 (1992) 596.

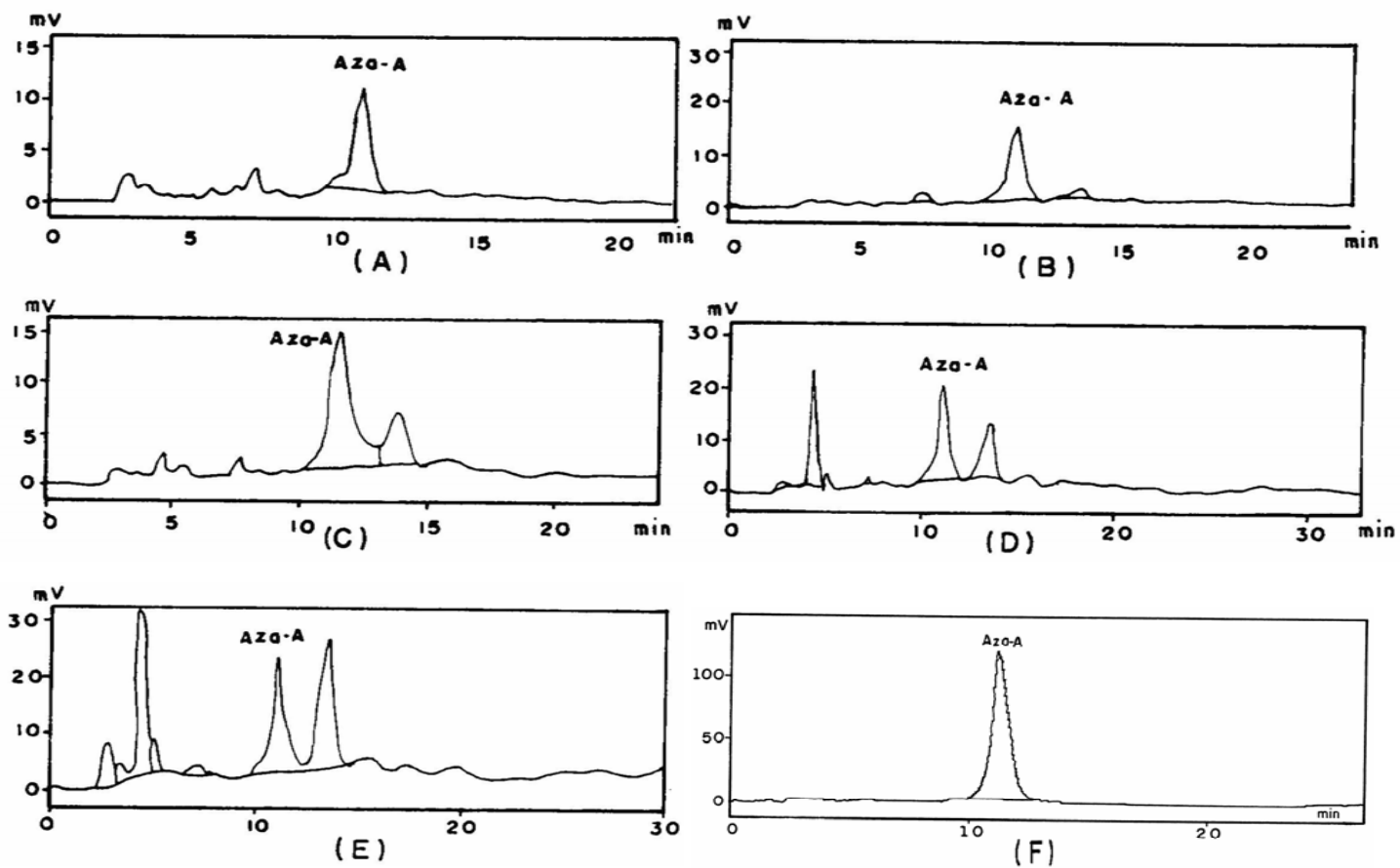


Figure 1. HPLC traces (analytical) of the fractions collected after countercurrent chromatography of Neem seed extract (aza-A 60) and of purified azadiractin A (aza-A). Traces A to E corresponded to fractions 9-13, respectively and trace F pure aza-A. For separation conditions see the experimental section.

Isolation of Six Minor Tetranortriterpenoids from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Seed Concentrate by Countercurrent Chromatography Followed by Preparative High Performance Liquid Chromatography

Júlio César Teixeira da Silva and Gulab N Jham *

Departamento de Química – Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Brazil

Reverse phase countercurrent chromatography (CCC) followed by reverse phase preparative high performance liquid chromatography (HPLC) were used to isolate the six minor tetranortriterpenoids (azadirachtin B-aza-B, azadirachtin H-aza-H, desacetylnimbim-dnim, nimbim-nim, desacetylsalanin-dsal and salanin-sal) in the seed concentrate (aza-A 60) of the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). The procedure involved portioning 4.2 g aza-A 60 (700 mg/run) on a CCC coil using the biphasic solvent n-hexane:n-butanol:methanol:water (1.0:0.9:1.0:0.9, v/v), elution at a flow of 2 ml/min and collection of thirty fractions (3 ml each). Reproducible, narrow polarity range extracts were obtained from repeated runs with a relatively small volume (116 ml) CCC coil. The CCC preparation time of 45 minutes and total solvent usage of approximately 200 ml represent major savings in time and cost, compared to literature based open tubular and Flash Chromatography published techniques. In addition, 97% of the injected material was recovered. After CCC fractionation and TLC monitoring, appropriate tubes from each of the six runs were combined to obtain two major fractions. From the first fraction (83% of the recovered), aza-H and aza-B were purified by preparative reverse phase HPLC using methanol-water (50:50, v/v) as the solvent at a flow of 6 ml/min. From the second fraction (10% of the recovered) dnim, nim, dsal and sal were similarly purified using methanol-water (60:40, v/v) as the solvent at a flow of 8 ml/min. All HPLC effluents were monitored at 217 nm. All compounds were approximately 96% pure as determined by analytical HPLC. All the compounds, except aza-H were identified by comparing their retention times to standards by analytical HPLC. The structures of all compounds were confirmed by ¹³C-NMR.

Keywords: Neem; Isolation; Minor tetranortriterpenoids, Countercurrent chromatography; Preparative high performance liquid chromatography.

* Corresponding author. E-mail: gulab@ufv.br

INTRODUCTION

The Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) is one of the richest sources of secondary metabolites in nature. More than 300 compounds have been isolated and characterized from Neem seed, one-third of which are tetranortriterpenoids (limonoids) (Kumar *et al.*, 1996). Azadirachtin A (aza-A) is the principal seed tetranortriterpenoid, presenting significant biological activity against a variety of insect pests (National Research Council, 1992; Schmutterer, 1995). In addition, several others tetranortriterpenoids present in smaller quantities, i.e., nimbim (nim) (Harris *et al.*, 1968) and salanin (sal) (Henderson *et al.*, 1968), etc have been isolated and shown to possess biological activity.

Several methods, such as preparative HPLC (Govindachari *et al.*, 1990,1992a,b, 1995,1996; Thejavathi *et al.*, 1995), flash chromatography (Yamasaki *et al.*, 1986; Jarvis *et al.*, 1999), column chromatography (Johnson and Morgan, 1997), MPLC (Sharma *et al.*, 2003), etc have been described for the isolation of neem tetranortriterpenoids. Separation of the minor components is particularly difficult. However, since all these procedures are very time consuming and need large volumes of solvents, they were not used in this study.

Countercurrent chromatography (CCC) is a liquid/liquid partition method that uses no solid support matrix. It is extensively utilized for the separation of gram quantities of natural plant products (Berthod, 2002; Du *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2002). To date, only one preliminary study was reported in the literature on the separation of aza-A from seeds (Hummel *et al.*, 1997).

We have used successfully the CCC/HPLC approach to isolate highly pure aza-A from Neem seed concentrate (Silva *et al.*, 2004). In this paper we have extended the same approach to isolate the six minor tetranortriterpenoids, i.e., aza-H, aza-B, nim, dsal, nim and sal (Figure 1) from Neem (*azadirachta indica*) seed concentrate.

EXPERIMENTAL

Solvents and reagents. All solvents and chemical reagents were of analytical grade and distilled before use. Water for chromatographic analyses was purified using MilliQ (Waters, USA) water purification system. The standards aza-B, sal, dsal, nim and dnim were kindly donated by Dr. Gopalakrishnan (SPIC Science Foundation, Madras, India). Neem seeds were purchased from Bionim (Brazil).

Extraction of tetranortriterpenoids. The isolation of tetranortriterpenoids in Neem seeds was carried out by a modified version of a method cited in the literature (Sharma *et al.*, 2003) and previously described in detail (Silva *et al.*, 2004). Briefly, five hundred grams of ground Neem seed kernels were extracted with hexane (3x500 ml) with a magnetic stirrer for 8 h (after each solvent addition) at room temperature (25°C) and the oil obtained after vacuum filtration was discarded. The residual de-fatted Neem cake was extracted with a magnetic stirrer for 8 h (after each solvent addition) at room temperature with methanol (5x500 ml) and the combined extracts were concentrated at 40°C in a rotatory evaporator. The extract (62 g) was partitioned between hexane (300 ml) and 90% aqueous methanol (300 ml) and the hexane layer discarded. Methanol was evaporated at 40°C in a rotatory evaporator and the oil obtained was partitioned between water (500 ml) and ethyl acetate (500 ml). After discarding the aqueous phase, the organic phase was treated with activated charcoal (4.0 g at 60°C for 25 min), filtered and the solution concentrated at 30°C in a rotatory evaporator to obtain a viscous orange oil (9.0 g). The oil was dissolved in ethyl acetate (10 ml) and compounds precipitated with an excess of hexane to obtain a residue (7.7 g) containing ~20% aza-A. The process of charcoal addition was repeated twice to obtain 4.0 grams of a brownish white powder containing ~60% of aza-A (aza-A 60). The procedure was repeated to obtain additional amounts of aza-A 60.

Solvent settling times and partition coefficient of aza-A 60 components. Solvent settling times of fifteen biphasic solvent systems without and with aza-A 60 (20 mg) were determined by vigorously hand mixing (20 sec) 1 ml of each component solvent and noting the time necessary to obtain two distinct phases (Silva *et al.*, 2004). The partition coefficient (K_D) of aza-A 60 components in the two phases of the fifteen solvent system were determined by silica gel TLC (20x20 cm) with toluene: ethyl acetate: methanol (10:1:2, v/v/v) as the solvent (Hummel *et al.*, 1997) and vanillin-sulfuric acid-ethanol (3g,1.5 ml:100 ml) as the developing reagent (Yamasaki *et al.*, 1986). The six tetranortriterpenoids, except aza-H, were identified by comparing their R_f values with those of the standards. The K_D was estimated from the formula: $K_D = [C]_{org} / [C]_{aqu}$ where K_D , $[C]_{org}$, and $[C]_{aqu}$ are the solute partition coefficients, concentration of the solute in the organic and aqueous phases, respectively. If the concentration of the solutes in both phases was approximately the same, K_D was defined as ~1 and if the concentration of the solutes was significantly higher in the organic phases, K_D was defined as >1.

Countercurrent chromatography. A AECS (Bridgend, UK), CCC (Model: Quattro CCC MK 4 LabPrep) consisting of two PTFE coils (1.6 mm i.d./3.2, o.d.) one preparative (116 ml) and the other analytical (26 ml), a HPLC pump (Shimadzu, Kyoto, Japan, model LC-6AD) a low-pressure injection valve and a PTFE 6-mL sample loop were used. This system was coupled to a fraction collector (Isco, USA, Model Foxy Jr.) programmed to collect 1.5 ml/min.

For CCC, appropriate volumes of solvents n-hexane-n-butanol:methanol:water (1:0.9:1:0.9, v/v) were vigorously hand mixed in a separating funnel for 10 min, transferred to a flask and allowed to sit overnight at room temperature. The following morning the solvents were degassed (ultrasonic) for 30 min and immediately used. Isocratic elution mode was conducted in head to tail manner with the upper organic phase as the stationary phase (reverse phase). The preparative column (116 ml) was entirely filled with the upper phase of the solvent system and rotated at 800 rpm at 30°C followed by lower solvent phase pumping at a flow-rate of 2.0 ml/min. After attaining hydrodynamic equilibrium, 700 mg of aza A 60 dissolved in a 1: 1 mixture of upper and lower phases were injected. Thirty fractions (3 ml each) were collected in 45 min. Tubes 9-13 and 17-30 from the six CCC runs were monitored by TLC, combined, lyophilized and weighed to obtain fractions one and two, respectively, which were further purified by preparative HPLC.

Semi-preparative and analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) to isolate the six tetranortriterpenoids. A liquid chromatograph (Shimadzu, Osaka, Japan, model LC-6AD), with the UV-VIS detector (Shimadzu, Osaka, Japan, model SP-10AVP with cell volumes of 7 and 20 μ L for analytical and preparative HPLC, respectively), data collection system (Shimadzu, Osaka, Japan, model class 5000) equipped with a Rheodyne injector was used for both analytical and preparative HPLC. For preparative HPLC, the LC-8 stainless-steel column (5 μ m, 250 x 21 mm id, Supelco) was used with a pre-column (5 μ m, 50 x 4.6 mm id, Supelco), which was hand filled with packing material LC-8 (5 μ m, Supelco). For analytical HPLC, a stainless-steel column (250 x 4.6 mm id, 5 μ m, Supelco) with a pre-column (20 x 4.6 mm id) containing the same material was used. For preparative and analytical HPLC, injections were made through 1000 and 100 μ L loops, respectively. Effluents were monitored at 217 nm.

Fractions one and two were purified by preparative RP-HPLC by injecting up to 70 mg/run. For fraction one, methanol: water (50:50, v/v) was used as the solvent at a

flow rate of 6 ml/min while for fraction two methanol: water (60:40, v/v) was used as the solvent at a flow rate of 8 ml/min. Pure aza-H and aza-B were obtained from fraction one while dnim, nim, dsal and sal from fraction two. Appropriate fractions were collected, TLC monitored, combined and the solvents evaporated at room temperature in a SpeedVac to obtain compounds which were evaluated by analytical HPLC. Purity of Aza-H and aza-B was evaluated using methanol: water (50:50, v/v) at a flow rate of 0.8 ml/min while that of dnim, nim, dsal and sal with methanol: water (50:50, v/v) as the solvent at a flow rate of 1 ml/min.

¹³C NMR. The liquid state ¹³C NMR spectra (50 MHz) were recorded on a Bruker Avance DPX -200 spectrometer equipped with a 5-mm dual mode ¹H/¹³C probe. The samples were dissolved in deuterated chloroform ($\delta^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3) = 77 \text{ ppm}$) and analyses were conducted at room temperature. Acquisition conditions were: pulse angle 30°, spectral width 4139.073 Hz, acquisition time 7.917 and repetition interval 1s. The number of accumulations was set at 16,000 repetitions. The six compounds giving one peak on analytical HPLC analysis, were analyzed by ¹³C NMR and the shift values were compared to the literature values.

RESULTS AND DISCUSSION

Given the potential of CCC described in the literature to purify gram quantities of pure natural products and our report on successfully isolating the major tetranortriterpenoid aza-A from Neem seed concentrate (Silva *et al.*, 2004), we decided to extend the method to purify minor tetranortriterpenoids. No information is available on CCC separation of these components.

The choice of biphasic solvent for CCC was described in our previous study (Silva *et al.*, 2004) and hence will be briefly discussed. Commonly used solvents, i.e., water, methanol, ethanol, i-propanol, ethylacetate, dichlorometane, petroleum ether, cyclohexane, chloroform and acetonitrile, were evaluated. Of the fifteen candidate biphasic solvent systems, thirteen were rejected as the settling times were too long, emulsions were formed or suitable partitioning did not occur. Thus, only two solvent systems, i.e., hexane: ethyl acetate/methanol: water and hexane: ethyl acetate/acetonitrile : methanol: water seemed satisfactory since they had short settling times (~30 seconds) and K_D of ~ 1. However, better CCC separation was achieved with the former solvent and hence was selected for further evaluation. The solvent system

was further optimized and n-hexane-n-butanol-methanol-water (1:0.9:1:0.9) gave the best separation being finally chosen for instrumental evaluation.

The next step was to evaluate on the instrument whether reverse or normal phase CCC would be optimal. Normal phase did not provide adequate separation, thus reverse phase was chosen. Several parameters, i.e., sample size injected, flow rates, reproducibility, volume of fractions collected, etc., were evaluated. Optimum separation was obtained with up to 700 mg of aza-A 60 injected with a flow rate of 2 ml/min, collection of 3 ml fractions, when utilizing a 116 ml PTFE coil of 1.6 mm bore, whilst rotating at 800 rpm. Under these conditions, the retention of the stationary phase in the CCC was 79%.

The thirty tubes from each of the six CCC experiments were monitored by TLC, the solvents were lyophilized and the residue weighed. Thus 97% of the material injected was recovered. The first eight tubes contained essentially the solvents. The first fraction (tubes 9-13 corresponding to 83% of the recovered) contained mainly the three azadirachtins A, B and H with the principal component being aza-A. Tubes 14-16 (corresponding to 7% of the recovered) contained compounds, which we did not attempt to identify being thus discarded. Fraction two, tubes 17-30 (corresponding to 10% of the recovered) contained dnim, dsal, nim and sal. Quantitative recoveries obtained in this study, were in agreement with our previous CCC/HPLC study where aza-A was purified from Neem seed concentrate (Silva *et al.*, 2004). Quantitative data were not reported with the only aza-A study in the literature (Humel *et al.*, 1997).

Since none of the fraction was pure and the quantity of compounds of interest was small (milligrams), preparative HPLC appeared to be our best choice for further purification. Attempts to utilize one solvent to separate the tetranortriterpenoids were not successful due to the long retention times and small tetranortriterpenoid amounts in relation to the principal component aza-A, accounting for about 60% of the total tetranortriterpenoids (Sharma *et al.*, 2003). This problem was particularly great in relation to aza-B and aza-H since they eluted close to aza-A. Tests with several solvent systems suggested that methanol-water provided the best separation.

Thus to purify aza-B and aza-H from fraction one by preparative HPLC, the best solvent system was methanol:water (50:50, v/v) at a flow of 6 ml/min. Similarly for dnim, dsal, nim and sal from fraction two, the best solvent system was methanol : water (60:40, v/v) at a flow rate to 8 ml/min. The purity of aza-B and H was monitored by analytical HPLC using methanol : water (50:50, v/v) at a flow of 0.8 ml/min (Fig.2 *trace a*), while that of dnim, dsam, nim and sal was monitored by analytical HPLC

using methanol : water (50:50, v/v) at a flow of 1 ml/min (Fig.2 trace b). All the six components have been reported in Neem seed (Govindachari *et al.*, 1979; Jarvis *et al.*, 1999, Sharma *et al.*, 2003; Barrek *et al.*, 2004).

Under these conditions it was possible to purify all the six compounds: aza-H (25 mg), aza-B (80 mg), dnim (24 mg), dsal (18 mg), nim (9 mg) and sal (30 mg) (Figure 3 A-F).

The compounds, except for aza-H were confirmed by comparing their retention times with those of standards using analytical HPLC. In addition, the ¹³C RMN chemical shifts of all the six compounds were in agreement with the literature values (Barrek *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 1997) (Table 2 , Figuras 5 a 8 – Anexos).

CONCLUSIONS

Modern CCC instrumentation has shown to offer a reproducible, rapid, low solvent cost alternative, to open tubular and Flash Chromatography procedures. The most significant advantage of CCC in the purification of complex natural products is that mass balance commonly occurs. However, this rarely occurs with the solid / liquid chromatography (SLC) preparative techniques. Mass balance was possible in this study. The narrow polarity range prepared by CCC supplemented by preparative HPLC procedures allowed to achieve 97 % purity of six minor Neem components. The described CCC/HPLC technique therefore offers significant advantages over the existing SLC literature methods.

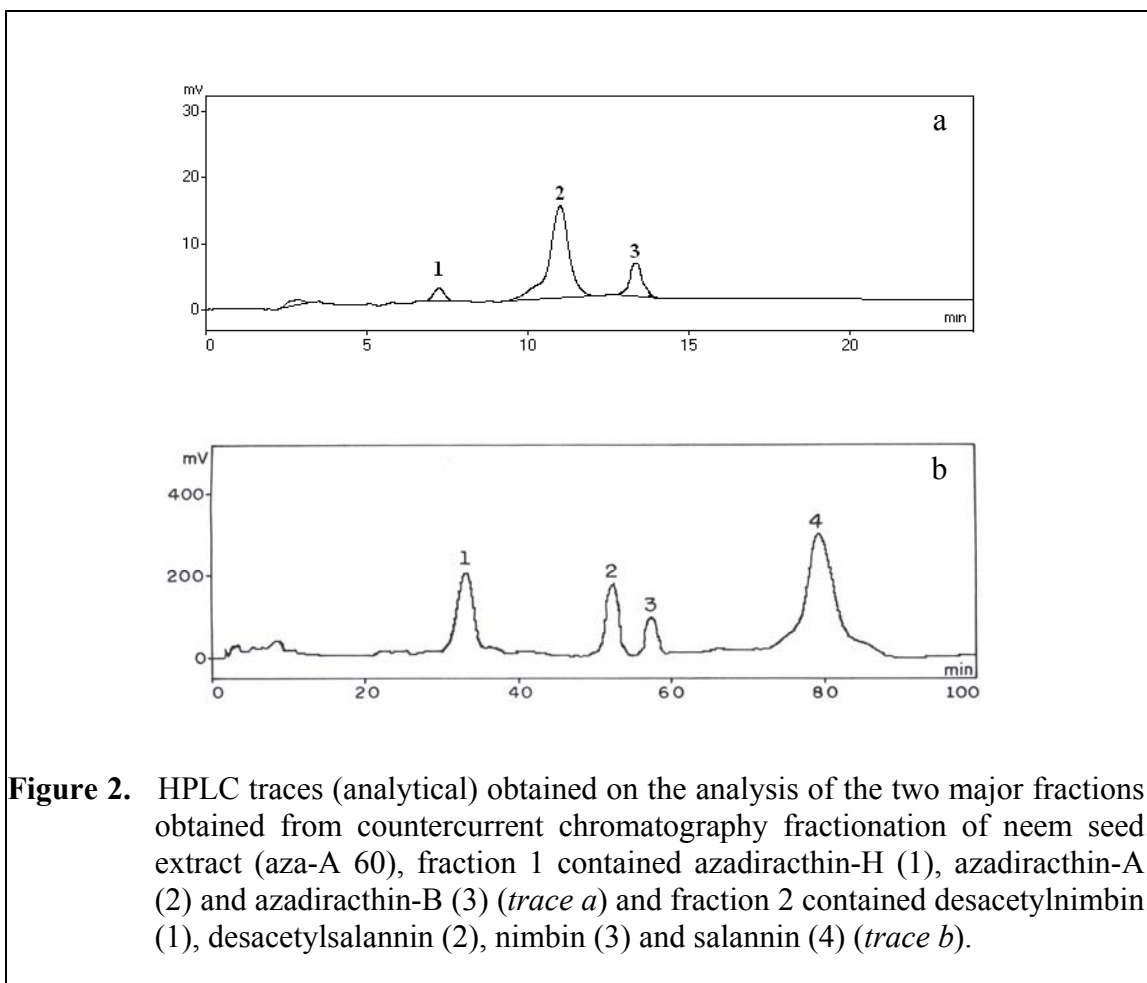
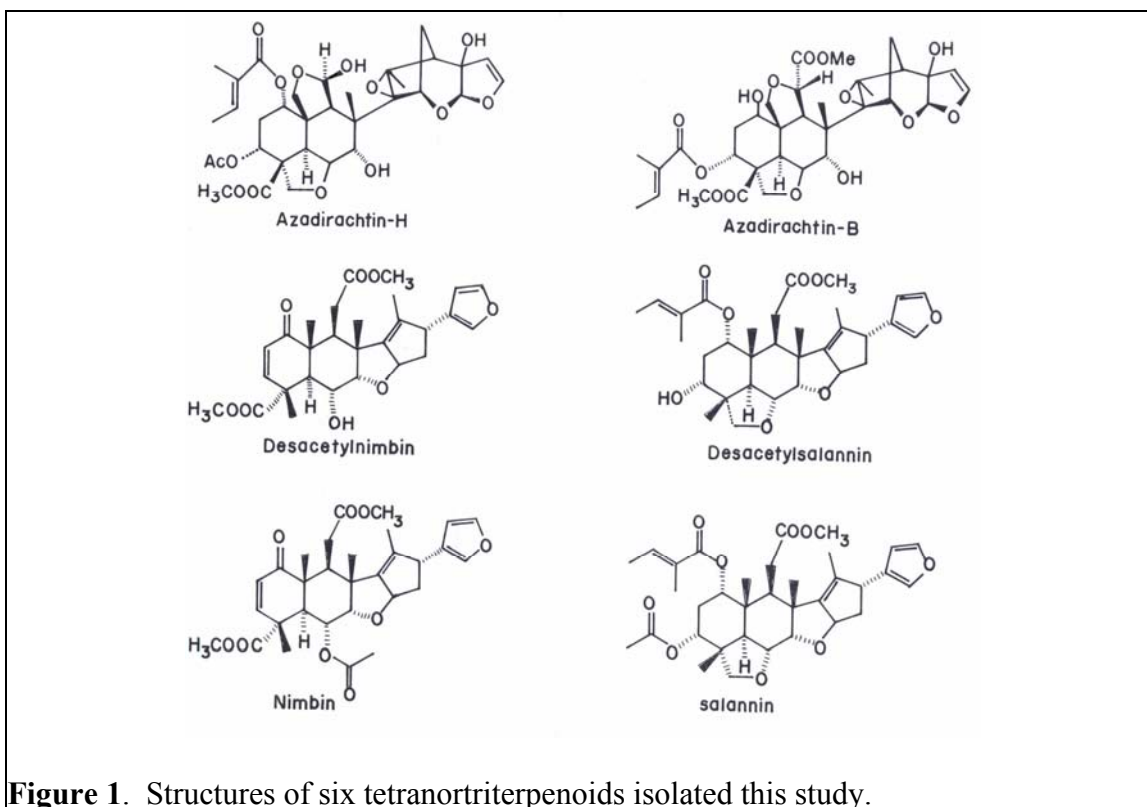
Acknowledgements

We would like to acknowledge the Brazilian agencies (FAPEMIG and CNPq) for their financial support. We would like to thank Dr. Gopalakrishnan for donating the standards. Fellowships (JCTS and GNJ) from CNPq are also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Barrek S, Paisse O, Grenier-Loustalot MF. 2004. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment – Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* **378**: 753-763.
- Berthod A (Ed.).2002. *Countercurrent Chromatography The Support-free Liquid Stationary Phase*, Elsevier, Amsterdam.
- Du Q, Jerz G, Winterhalter P. 2003. Separation of andrographolide and neoandrographolide from the leaves of *Andrographis paniculata* using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr* **984**: 147-151.
- Govindachari TR, Sandhya G, Ganesh Raj SP. 1990. Simple method for the isolation of azadirachtin by preparative high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **513**: 389-391.
- Govindachari TR, Sandhya G, Ganesh Raj, SP. 1992a. Structure of azadirachtin K, a new tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*. *Ind J Chem* **31B**: 295-298.
- Govindachari TR, Sandhya G, Ganesh Raj, SP. 1992b. Azadirachtins H e I: two new tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *J Nat Prod* **55**: 596-601.
- Govindachari TR, Suresh G, Gopalakrishnan G. 1995. A direct preparative high performance liquid chromatography procedure for the isolation of major triterpenoids and their quantitative determination in neem oil. *J Liquid Chromatogr* **18**: 3465-3471.
- Govindachari TR, Gopalakrishnan G, Suresh G. 1996. Isolation of various azadirachtins from neem oil by preparative high performance liquid chromatography. *J Liq Chrom & Rel Technol* **19**: 1729-1733.
- Han X, Zhang T, Wei Y, Cao X, Ito Y. 2002. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr* **971**: 237-241.
- Harris M., Henderson R, McCrindle M., Overton KH, Turner DW. 1968. Tretanortriterpenoids VIII. The constitution and stereochemistry of nimbim. *Tetrahedron* **24**: 1517-1523.
- Henderson R , McCrindle M., Melera A, Overton KH. 1968. Tretanortriterpenoids IX. The constitution and stereochemistry of salannin. *Tetrahedron* **24**: 1525-1528.
- Hummel HE, Hein DF, Ma Y, Ito Y, Chou EF. 1997. Isolation and characterization of the insect development modifier azadirachtin A by various MLCCC methods. *Med Fac Landbouw Univ Gent* **62**: 213-223.
- Jarvis AP, Morgan ED, Edwards C. 1999. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. *Phytochem Anal* **10**: 39-43.
- Johnson S, Morgan ED. 1997. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J Chromatogr* **761**: 53-63.
- Kumar CSSR, Srinivas M, Yakkundi S.1996. Limonoids from the seeds *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* **43**: 451-455.
- National Research Council. 1992. *Neem, A tree for Solving Global Problems*, National Academy Press, Washington DC.
- Schmutterer, H. 1995. *Insecta, insects In The Neem Tree* (H. Schmutterer, ed.), VCH, Weinheim.
- Sharma V, Walia S, Kumar J, Nair MG, Parmar BS. 2003. An efficient method for the purification and characterization of nematicidal azadirachtins A, B and H, using MPLC and ESIMS. *J Agric Food Chem* **51**: 3966-3972.

- Silva JCT, Jham GN, Oliveira RDL, Brown L. 2004. Isolation of Azadirachtin A from Neem (*Azadirachta indica*) seed concentrate by counter-current chromatography followed by preparative high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* – Submitted.
- Thejavathi R, Yakkundi SR, Ravindranath B. 1995. Determination of Azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *J Chromatogr* **705**: 374-379.
- Yamasaki RB, Klocke JA, Lee, SM, Stone GA, Darlington, MV.1986. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **356**: 220-226.



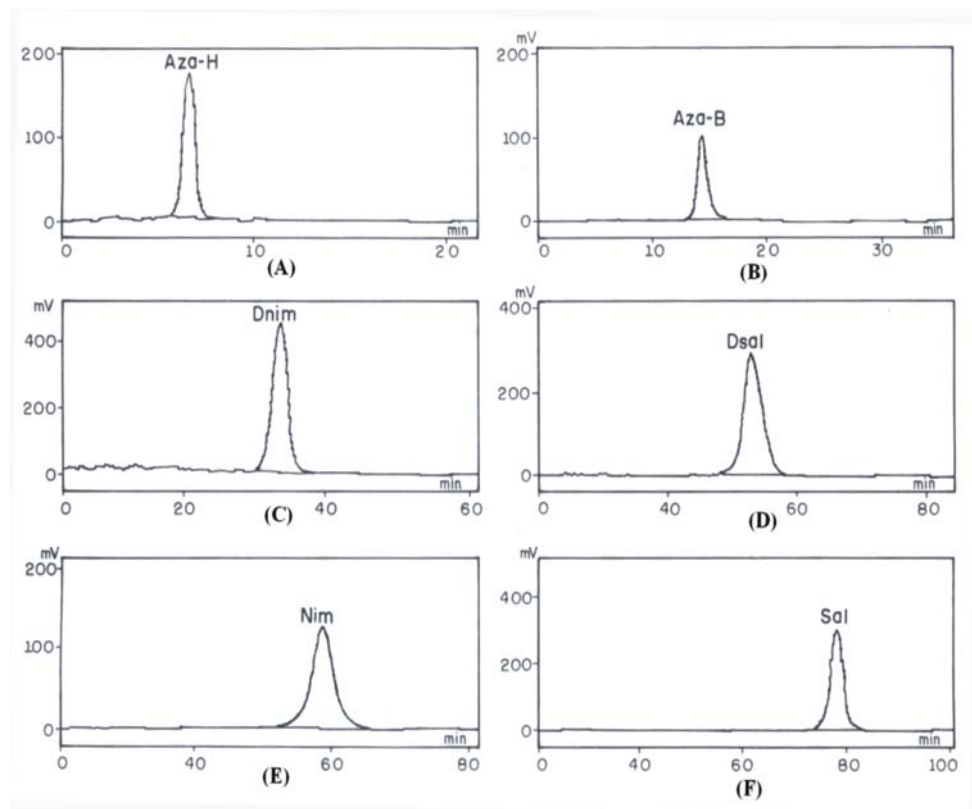


Figure 3. HPLC traces (analytical) of the purified compounds (CCC followed by preparative HPLC) azadirachtin-H (A), azadirachtin-B (B), desacetylnimbin (C), desacetylsalannin, (D), nimbin (E) and salannin (F).

Capítulo

EFEITO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS BRUTOS E COMPOSTOS PUROS ISOLADOS DE SEMENTES DE NIM (*Azadirachta indica*) SOBRE *Heterodera glycines*

1. INTRODUÇÃO

O nematóide *Heterodera glycines* Ichinohe, também conhecido como Nematóide de cistos da soja (NCS), causa a doença denominada Nanismo Amarelo, assim chamada devido aos sintomas produzidos nas plantas infectadas (NOEL, 1992). No Brasil, este patógeno foi detectado pela primeira vez na safra 1991/1992, em lavouras situadas nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, infectando cerca de 10 mil hectares (MENDES, 1993). Hoje estima-se que a área infectada com o nematóide seja superior a 2,0 milhões de ha e as perdas causadas devam somar mais de 150 milhões de reais (EMBRAPA SOJA, 2004). É considerada uma das principais pragas da cultura e tem preocupado os sojicultores de todo o mundo, não só pelos danos e prejuízos causados, mas pela facilidade de disseminação e longa sobrevivência dos ovos encistados no campo (NOEL, 1992).

O controle do NCS, bem como de outros nematóides, é bastante complexo. O controle por meio de resistência genética, embora seja o método mais econômico e eficiente, é limitado pela escassez de cultivares resistentes adaptadas às diferentes regiões produtoras de soja, sendo que os principais cultivares de soja usados no Brasil são suscetíveis (FERRAZ *et al.*, 1999). Além disso, o uso exclusivo de variedades resistentes pode provocar pressão de seleção de raças, devido à grande variabilidade genética desse parasita (SILVA e GARCIA, 1997). Os nematicidas sintéticos atuais vêm sofrendo limitações de uso em muitos países devido a fatores toxicológicos, ambientais e econômicos, tornando o seu uso restrito no controle de fitonematóides (NASCIMENTO, 1999; FRIGHETTO, 2000). O método de rotação de culturas com espécies não-hospedeiras e plantas antagonistas é considerada uma boa opção para o manejo desses fitonematóides, embora exista a possibilidade dessas plantas serem hospedeiras de outros patógenos que venham a atacar a cultura de soja (FERRAZ *et al.*,

1999). O controle biológico utilizando-se de microorganismos, embora muito pesquisado, carece de maiores estudos quanto a seleção de organismos efetivos e sua formulação afim de aumentar sua capacidade de estabelecimento e ação no solo (SALGADO, 2001).

Na busca por métodos ecologicamente corretos e economicamente viáveis, vem-se estudando o uso de extratos vegetais no controle de diversos nematóides fitopatogênicos (SCRAMIM *et al.*, 1987; GONZALEZ e ESTEVEZ-BRAUN, 1997; AMARAL *et al.*, 2002; SALGADO e CAMPOS, 2003; DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2003).

A árvore indiana Nim (*Azadirachta indica*), conhecida há séculos por ser uma fonte de inúmeros pesticidas naturais, já é utilizada no combate a diversas pragas que acometem importantes culturas (MARTINEZ, 2002). Algumas particularidades do nim tornam-o bastante promissor para o controle de pragas: é rústico, se desenvolve sob condições adversas, não precisa ser destruído para produção de extratos, possui uma gama de compostos complexos similares, o que reduz a probabilidade de resistência dos organismos afetados, é inofensivo ao homem e seus produtos possuem baixa persistência no ambiente (MOURÃO *et al.*, 2004).

Vários trabalhos relatam com sucesso o uso de óleo, torta e de extratos brutos de várias partes da planta, além da incorporação de partes vegetativas e sementes diretamente no solo visando ao controle de inúmeras espécies de nematóides (GUPTA *et al.*, 1993; SCHMUTTERER, 1995; KHURMA e SINGH, 1997; AKTAR e AKHTAR, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001).

Geralmente atribui-se a bioatividade dos derivados do nim à quantidade de ingrediente ativo do seu principal metabólito secundário, azadiractina-A (GOVINDACHARI, *et al.*, 1996; MARTINEZ, 2002). Porém, um grande número de outros tetranortriterpenóides, presentes em menores quantidades, tem exibido significativa atividade biológica (SHARMA *et al.*, 2003). Entretanto, a literatura disponível não tem contemplado informações à respeito dos efeitos dos triterpenóides isolados do nim no controle de nematóides.

Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho estudar o efeito *in vitro* e *in vivo* dos extratos brutos e triterpenóides puros, isolados de sementes de nim, na eclosão, mobilidade, mortalidade e no desenvolvimento de *Heterodera glycines* em soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Metodologia Geral

2.1.1. Obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*

O nematóide *Heterodera glycines*, raça 3, foi multiplicado em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) da cultivar Conquista, sob condições de casa de vegetação por cerca de 2 anos. Para extração dos ovos, colocaram-se as raízes lavadas sobre a peneira de 0,85 mm de abertura, acoplada a outra de 0,15 mm e sob forte jato de água retiraram-se as fêmeas que ficaram retidas na peneira de 0,15mm. Nesta, elas foram esmagadas com o auxílio de um tubo de ensaio para a liberação dos ovos que foram recolhidos em peneira de 0,025 mm. Estes foram então transferidos para câmaras de eclosão (LIMA e FERRAZ, 1985). Foram selecionados J2 entre 12 e 48 horas de idade. Quantificaram-se os juvenis com o auxílio de câmara de Peters sob microscópio estereoscópico e a suspensão foi calibrada para 1000 juvenis/mL, exceto quando especificado diferentemente.

2.1.2. Preparo dos extratos brutos de Nim

Os extratos brutos hexânico, metanólico e aquoso foram preparados de acordo com a metodologia de extração seqüencial. Trituraram-se 50 g de sementes nuas de nim em liquidificador que foram transferidas para um erlenmeyer contendo 200 mL de hexano destilado. Deixou-se extrair, sob agitação magnética, por 6 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi feita uma filtração a vácuo onde recolheu-se o filtrado e o resíduo obtido foi reextraído por mais 2 (duas) vezes com hexano. Após as extrações juntaram-se os filtrados e eliminou-se o solvente através de um evaporador rotatório, resultando em 9 g de um óleo de coloração amarela. O resíduo retido no papel foi transferido para um segundo erlenmeyer contendo 200 mL de metanol, deixando-se extrair nas mesmas condições descritas para o extrato hexânico. Assim, após a realização de todas as etapas, obtem-se 4 g de um extrato de coloração verde escuro. Finalmente, o resíduo resultante dos processos anteriores foi secado em estufa à 40°C por 3 horas, pesado (5 gramas) e em seguida transferido para um outro erlenmeyer contendo 60 mL de água para a realização de uma nova extração nas mesmas condições por mais 15 h. Após, foi feita novamente uma filtração e o filtrado contendo o extrato

aquoso bruto de nim, com rendimento de 50 mL, foi separado e o resíduo contido no papel descartado. Para a realização dos bioensaios foram preparadas diluições de 1000 ppm e 100 ppm para os extratos metanólico e hexânico, solubilizados em solução de Tween-80 (1% v/v) e diluições de (1/2 e 1/10, v/v) para o extrato aquoso, utilizando-se de água destilada. Todos os extratos foram armazenados em frascos escuros devidamente vedados e mantidos em geladeira até o momento de utilização nos ensaios.

O fluxograma na figura 1 mostra a metodologia de extração seqüencial adotada para obtenção dos extratos brutos hexano, metanol e aquoso de sementes de nim.

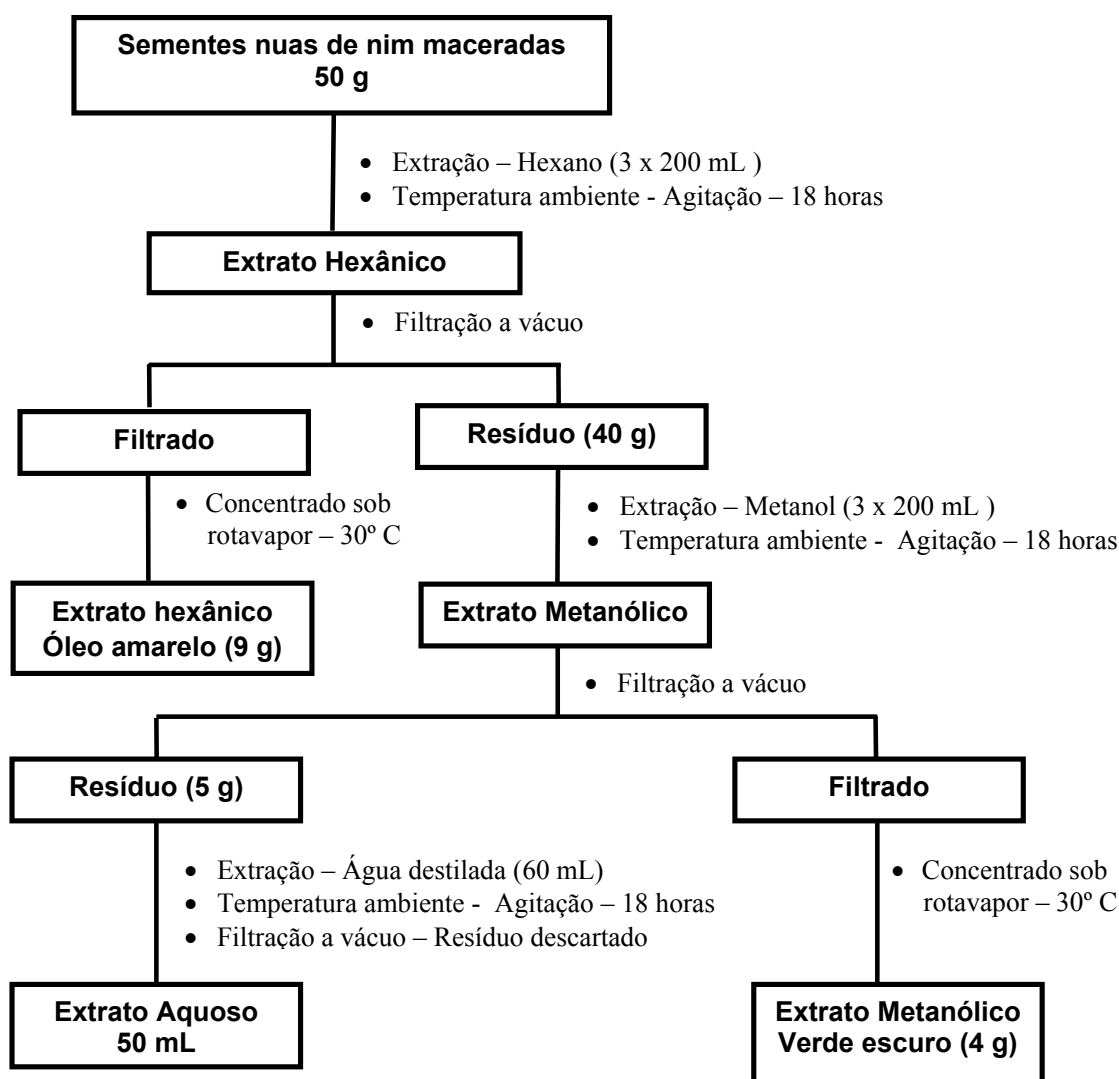


Figura 1 : Fluxograma da extração seqüencial para obtenção dos extratos brutos hexânico, metanólico e aquoso.

2.1.3. Obtenção do extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60)

O extrato Aza-A 60, obtido a partir de extrato metanólico de sementes de nim, foi preparado seguindo a metodologia proposta por SILVA *et al.* (2004). Quinhentos gramas de sementes nuas maceradas de nim foram extraídos seqüencialmente com hexano e metanol. Submeteu-se o extrato metanólico obtido a diversas etapas de partição com hexano, acetato de etila e água e tratamento com carvão ativo, obtendo-se finalmente 4,0 gramas de um pó contendo 60% de azadiractina A. O pó foi solubilizado em solução do detergente Tween 80 a 1% (v/v) e prepararam-se soluções cujas concentrações finais foram: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm. Estas soluções foram devidamente vedadas e armazenadas em geladeira.

2.1.4. Isolamento dos triterpenóides a partir de extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60)

Os limonóides azadiractina A (Aza-A), azadiractina B (Aza-B), azadiractina H (Aza-H), desacetilnimbim (Dnim), desacetilsalanim (Dsal), nimbim (Nim) e salanim (Sal) foram isolados mediante purificação do extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60), utilizando-se da metodologia proposta por SILVA *et al.* (2004) e SILVA e JHAM (2004). De posse dos limonóides isolados prepararam-se soluções estoques à 100 ppm (250 mL), mediante solubilização de cada substância em solução aquosa do surfactante Tween 80 a 1% (v/v). A partir dessas soluções foram preparadas 3 diluições, 1, 10 e 100 ppm, para cada composto. As diluições foram mantidas em geladeira, até a sua utilização nos bioensaios.

2.1.5. Análise estatística

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado com 6 ou 7 repetições, utilizando-se água como testemunha. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas em Genética (EUCLYDES, 1983).

2.2. Efeito *in vitro* dos extratos brutos de sementes de nim na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*

A mobilidade de J2 nos extratos foi avaliada de acordo com o método do tubo invertido proposto por KIMURA *et al.* (1981), com algumas modificações.

Dessa forma, retiraram-se 2,5 mL das soluções de extratos brutos, obtidos conforme descrito em 2.1.2 e transferiram-se para tubos-teste (5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro) contendo 0,1 mL de suspensão de nematóides (500 J2). Os tubos foram tampados com camada dupla de lenço de papel permeável e incubados no escuro por 24 horas, à 26°C. Montou-se o ensaio com 7 repetições por tratamento. Ao término deste período, os mesmos foram invertidos sobre placas de Petri (5cm de diâmetro) e novamente incubados por 24 horas nas mesmas condições. Após esse tempo, realizou-se a contagem dos nematóides presentes em cada placa, com auxílio de um microscópio estereoscópico. Consideraram-se móveis (vivos) os nematóides (J2) recuperados após atravessarem o aparato de extração.

A atividade nematicida de cada tratamento foi calculada em relação à percentagem de imobilidade, conforme a seguinte equação:

$$\text{Imobilidade (\%)} = 100 - [(Y \times 100) / X]$$

Em que : X = média do número de nematóides recuperados na testemunha e

Y = média do número de nematóides recuperados nos tratamentos.

2.3. Avaliação do desenvolvimento de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, em soja, após tratamento com extratos brutos de nim

Em vasos contendo 2 L de uma mistura solo:areia (1:1), previamente tratada com brometo de metila, foram semeadas 3 sementes de soja da cultivar Conquista. Após a germinação fez-se o desbaste deixando-se uma planta por vaso. Nesse período, foram adicionados em erlenmeyers distintos 35mL de cada solução dos extratos brutos nas suas respectivas diluições, preparadas conforme seção 2.1.2, mais 1 mL de suspensão de nematóides (1100 J2/mL). Tais erlenmeyers foram encubados à 26°C, ao abrigo da luz, durante 24 horas. Após, efetuou-se a inoculação usando-se 5 mL de cada suspensão

(tratamento + juvenis) por vaso. Os vasos, 7 repetições por tratamento, foram mantidos em casa de vegetação durante 30 dias em condições ideais para o desenvolvimento da planta.

Após esse tempo, as plantas foram retiradas dos vasos, descartando-se a parte aérea. As raízes foram submetidas à extração das fêmeas e ovos, conforme descrito na seção 2.1.1. Em seguida, contaram-se o número de fêmeas e ovos em câmaras de contagem com auxílio de um microscópio estereoscópico.

2.4. Efeito do extrato de Aza-A 60 na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* in vitro

Os juvenis, obtidos conforme metodologia descrita em 2.1.1, foram diluídos para uma suspensão de 147 J2/mL de água. Em cada tubo-teste, de acordo com o método descrito em 2.2, adicionaram-se 1 mL da suspensão de juvenis e 2,5 mL de cada solução de resíduo de Aza-A 60 nas concentrações: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 ppm, preparadas na seção 2.1.3. As concentrações finais das soluções do extrato de Aza-A 60 resultaram em 0,007; 0,07; 0,7; 7 e 70 ppm devido ao volume da suspensão aquosa de nematóides. O ensaio foi montado com 6 repetições por tratamento. Após 48 horas quantificou-se os J2 e calculou-se a atividade nematicida através da % de imobilidade dos juvenis.

2.5. Avaliação da mortalidade, in vitro, de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* tratados com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60

Primeiramente, foi preparada uma suspensão de J2 com aproximadamente 600 J2/mL de água, conforme seção 2.1.1. Seguindo a metodologia do tubo invertido, já descrita na seção 2.2, transferiram-se para cada tubo-teste 2,5 mL de cada solução das substâncias Aza-A, Aza-B, Aza-H, Dnim, Dsal, Nim e Sal, nas diluições de 1, 10 e 100 ppm, preparadas na seção 2.1.4, mais 0,5 mL da suspensão de nematóides. As concentrações das soluções-teste resultaram nas diluições 0,8, 8 e 80 ppm. Após 48 horas, avaliou-se o número de juvenis ativos e, posteriormente, a percentagem de mortalidade desses.

A confirmação da mortalidade dos juvenis foi realizada utilizando-se a metodologia proposta por CHEN e DICKSON (2000). Para tal, 1mL de suspensão de nematóides (300 J2) foi transferido para tubos de ensaio (5 mL) contendo 2,5 mL de

cada solução (100 ppm) dos triterpenóides isolados. A concentração final de cada solução-teste foi de 80 ppm. Em seguida os tubos foram mantidos em incubadora à 26°C durante 24 horas. Passado esse período, transferiu-se 100 µL da suspensão para lâminas escavadas para leitura em microscópio. Em seguida contou-se o número de (J2) presentes na lâmina e adicionou-se 2 gotas de solução de NaOH 1 mol/L (50-100 µL). Num período de até 3 minutos, quantificaram-se os juvenis que reagiram com movimento à solução da base, os quais foram considerados vivos. Foram realizadas 2 contagens por tratamento. A partir daí, calculou-se a percentagem de J2 verdadeiramente mortos.

2.6. Avaliação do desenvolvimento de *Heterodera glycines*, em soja, após tratamento com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60

Inicialmente prepararam-se vasos em casa de vegetação, cada um deles contendo uma planta de soja, conforme a seção 2.3. Nesse tempo, foram adicionados em diferentes erlenmeyers, 20 mL de cada solução das substâncias Aza-A, Aza-B, Aza-H, Dnim, Dsal, Nim e Sal à 100 ppm, preparadas conforme 2.1.4, mais 5 mL da suspensão de nematóides (aproximadamente 1400 J2), preparada conforme seção 2.1.1. As soluções-teste tiveram suas concentrações reajustadas para 80 ppm. Tais erlenmeyers foram encubados à 27°C, ao abrigo da luz, durante 24 horas. Após, efetuou-se a inoculação utilizando-se de 4 mL de cada suspensão (tratamento + juvenis) por vaso. Os vasos, distribuídos em 6 repetições por tratamento, foram mantidos em casa de vegetação durante 30 dias, conforme seção 2.3.

Após esse período, as plantas foram retiradas dos vasos e efetuou-se a extração de fêmeas e ovos presentes nas raízes, conforme seção 2.1.1. Avaliou-se a contagem do número de fêmeas e ovos através de câmaras de contagem sob microscópio estereoscópico.

2.7. Efeito de triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60 na eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*

Os ovos de *H. glycines* foram obtidos conforme descrito na seção 2.1.1, onde calibrou-se a suspensão para 2500 ovos/mL. Montaram-se as câmaras de eclosão utilizando-se de placas de Petri (5 cm de diâmetro), nas quais foram adicionados 5 mL

de cada solução das substâncias puras Aza-A, Aza-B, Aza-H, Dnim, Dsal, Nim e Sal à 100 ppm, preparadas conforme seção 2.1.4. A placa foi coberta com tela de náilon (1mm² de abertura) + lenço de papel permeável e sobre tais câmaras foram depositados aproximadamente 1000 ovos (0,4 mL da suspensão). Cada placa constituiu uma unidade experimental repetida 7 vezes. As câmaras de eclosão foram mantidas no escuro em incubadora regulada para 26,5 °C. O experimento foi avaliado de 48 em 48 horas, por 10 dias quando as soluções eram trocadas. Após a 5ª contagem (10º dia), a solução-teste presente em cada placa foi substituída por água destilada, realizando-se mais duas contagens (96 h) posteriormente. As leituras constituíram-se da contagem dos J2 eclodidos a cada 48 horas, sob microscópio estereoscópico. A percentagem de eclosão foi calculada comparando-se o somatório do número de juvenis eclodidos após exposição aos tratamentos, no intervalo de 0 à 240 h, com o somatório obtido para os juvenis eclodidos em água no mesmo intervalo de tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito *in vitro* dos extratos brutos de sementes de nim na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*

O número de J2 vivos tratados com os extratos aquosos (1/2 e 1/10 v/v) não diferiu significativamente (P 0,05) daquele com extrato metanólico a 1000 ppm, entretanto diferiu quando a concentração usada foi 100 ppm (Tabela 1). Quanto ao percentual de J2 imóveis, observou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, sobressaindo-se o uso do extrato metanólico a 1000 ppm e dos extratos aquosos (1/2 e 1/10 v/v), que ocasionaram uma redução de aproximadamente 100 % na mobilidade dos J2 (Figura 2). Já o extrato metanólico a 100 ppm proporcionou uma redução de apenas 48%. Não se verificou diferença estatística entre os extratos hexânico e a água (testemunha), confirmando a ineficácia desse extrato na mobilidade de *H. glycines in vitro*.

Tabela 1 - Número de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* recuperados pelo funil Baermann após tratamento com diferentes extratos obtidos a partir de sementes de nim.

TRATAMENTOS	Nº DE J2 VIVOS *
Extrato aquoso 1/2 (v/v)	** 3,14 a
Extrato aquoso 1/10 (v/v)	3,00 a
Extrato Metanólico 1000 ppm	1,14 a
Extrato Metanólico 100 ppm	127,14 b
Extrato Hexânico 1000 ppm	223,20 c
Extrato Hexânico 100 ppm	210,14 c
Água	245,14 c

* Média de 7 repetições.

** As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

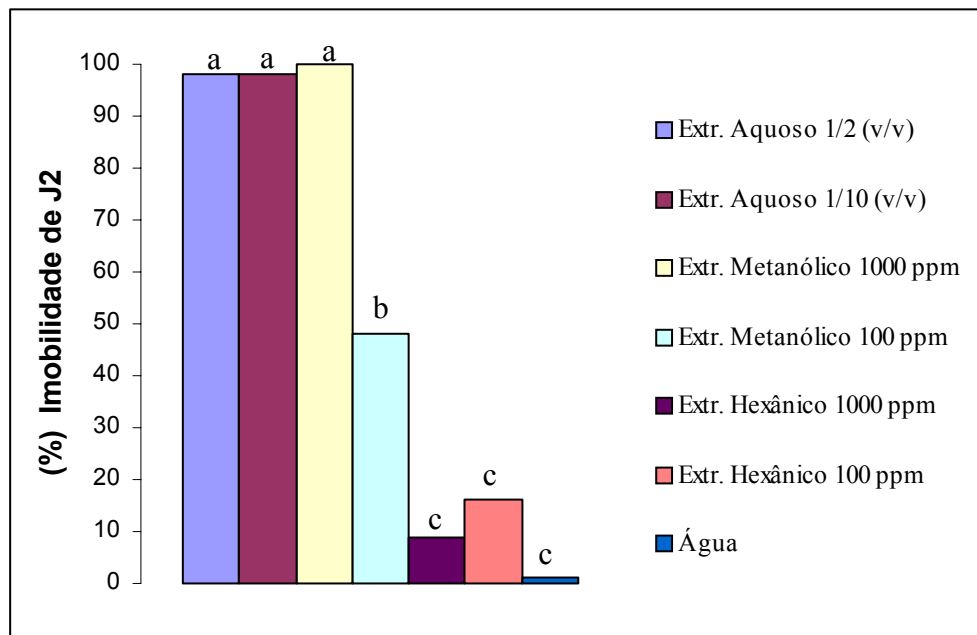


Figura 2: Percentagem de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* imobilizados pela ação de diferentes extratos obtidos a partir de sementes de nim. As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os extratos alcoólicos de sementes de nim são amplamente utilizados no controle e combate a diversas pragas e doenças, inclusive nematóides (NATIONAL RESEARCH, 1992). Sabe-se que estes extratos são ricos em tetranortriterpenóides (limonóides) e tais substâncias, como a Azadiractina A, por exemplo, conferem a maior parte da atividade biológica destes extratos (GOVINDACHARI *et al.*, 1996; MARTINEZ, 2002; JHONSON e MORGAN, 1997a; SHARMA *et al.*, 2003).

A atividade nematicida dos extratos aquosos de sementes de nim, preparados de forma direta (tradicional), é bem conhecida na literatura, tendo sua atividade comprovada sobre diversos nematóides (KHURMA e SINGH, 1997; DEBANAND *et al.*, 2000). Recentemente, RODRIGUES *et al.* (2001) comprovaram a eficiência desses extratos na mortalidade de *H. glycines*, *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, os extratos aquosos obtidos pelo método de extração seqüencial possuem uma quantidade mínima dos limonóides, presentes em alta concentração nos extratos metanólicos e aquosos tradicionais. Assim, acredita-se que outras substâncias possam estar sendo responsáveis pela atividade notória dos extratos aquosos testados. Segundo JOHNSON e MORGAN (1997b), alguns compostos de elevada polaridade, como sais, glicosídeos, pigmentos e derivados protéicos, estão presentes na matrix celular de sementes de nim, sendo extremamente solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos. Um exemplo dessas substâncias é a classe de glicosídeos saponínicos. As saponinas triterpenoídicas,

encontradas em maior abundância na natureza, são extremamente tóxicas à insetos e moluscos e possuem como característica a formação de espuma em meio aquoso mediante agitação (ROBBERS *et al.*, 1997). Pôde-se observar durante o preparo dos extratos aquosos a formação de espuma quando os mesmos eram mantidos sob agitação. Assim, todos esses indícios levam a crer que tais saponinas podem estar presentes nos extratos aquosos de sementes nim obtidos de forma seqüencial, sendo responsáveis pela atividade nematicida desses.

A ausência de atividade dos extratos hexânicos nas dosagens utilizadas sobre os juvenis de *H. glycines* pode ser explicada pelo fato de que tais extratos possuem uma quantidade mínima das principais substâncias ativas (triterpenóides), que geralmente estão presentes em elevadas concentrações nos extratos aquosos e, principalmente, nos extratos alcoólicos de sementes de nim (NATIONAL RESEARCH, 1992; JOHNSON e MORGAN, 1997b). Isto é devido ao baixo poder de extração apresentado pelo hexano e outros solventes lipofílicos, frente aos triterpenóides ativos polares presentes nas sementes de nim (JARVIS, *et al.*, 1999). Sabe-se que os extratos hexânicos de nim são constituídos principalmente pela parte oleosa das sementes, rica em triacilgliceróis e ácidos graxos livres como o oléico, palmítico e esteárico (SKELLON *et al.*, 1962, citado por JOHNSON e MORGAN, 1997b). Assim, este óleo não é considerado um biopesticida efetivo (NATIONAL RESEARCH, 1992). Entretanto, novas pesquisas vêm demonstrando que este óleo, em certos casos, pode matar ovos de insetos, larvas de mosquitos, além de afetar os estágios de vida de diferentes pragas (NATIONAL RESEARCH, 1992).

3.2. Avaliação do desenvolvimento de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, em soja, após tratamento com extratos brutos de nim

Plantas inoculadas com juvenis tratados com extratos de nim produziram menos fêmeas e ovos (P 0,05) quando o tratamento foi com extrato aquoso (1/2 v/v) ou metanólico (1000 ppm) (Tabela 2). Em relação aos outros tratamentos com menor eficiência sobre os nematóides, merece destaque o extrato hexânico. Foi demonstrado no teste *in vitro* (seção 3.1) que este extrato não apresentou atividade significativa na mobilidade de *H. glycines*. Entretanto, pôde-se verificar no teste *in vivo*, que embora o extrato hexânico, nas duas dosagens utilizadas (100 e 1000 ppm), não tenha apresentado diferença estatística (P 0,05) em relação à testemunha, a dosagem a 1000 ppm

apresentou uma redução do número de fêmeas e ovos de 34% e 62%, respectivamente, ao passo que a 100 ppm, a redução foi de 32% para o número de fêmeas e 43% para o número de ovos. Assim, pode-se dizer que embora o extrato hexânico não cause a morte dos J2, ele interfere no desenvolvimento das outras fases do ciclo de vida. Por exemplo, poderiam reduzir a penetração dos juvenis nas raízes das plantas hospedeiras, à semelhança do que ocorre com os nematicidas sistêmicos convencionais, uma vez que esses produtos causam o desorientamento dos nematóides dificultando a localização da planta (SPURR JÚNIOR, 1985).

Tabela 2: Número de fêmeas e ovos de *Heterodera glycines* por sistema radicular de soja 'Conquista' após a inoculação dos juvenis de segundo estágio tratados com extratos brutos de nim.

Extratos	Nº de Fêmeas*	Nº Ovos*
Extrato Aquoso 1/2 (v/v)	** 1,30 bc	** 139,00 b
Extrato Aquoso 1/10 (v/v)	3,70 abc	507,10 ab
Extrato Metanólico 1000 ppm	1,00 c	105,40 b
Extrato Metanólico 100 ppm	11,00 a	1158,80 ab
Extrato Hexânico 1000 ppm	6,90 abc	599,40 ab
Extrato Hexânico 100 ppm	7,10 abc	894,14 ab
Testemunha (Água)	10,40 ab	1577,40 a

* Média de 7 repetições.

** Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.3. Efeito do extrato de Aza-A 60 na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines in vitro*

Verificou-se que o extrato Aza-A 60 mostrou ser extremamente eficiente na redução da mobilidade (P 0,05) dos J2 (Tabela 4), uma vez que soluções de concentrações relativamente baixas, por exemplo 70 ppm, causaram aproximadamente 92% de imobilidade dos nematóides (Figura 3). A curva $y = 0,7464x + 18,345$ (Figura 3) revelou que o aumento da porcentagem de imobilidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração das soluções testadas, confirmada através da aplicação da regressão linear simples, cujo valor foi de $r^2 = 0,94$.

Tabela 4 - Número de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* recuperados pelo funil Baermann após tratamento com o extrato de Aza-A 60 em diferentes concentrações.

Concentrações de Aza-A 60 (ppm)	Nº DE J2 VIVOS *
70	** 7,0 d
7	58,2 c
0,7	67,0 bc
0,07	67,7 bc
0,007	74,2 b
Testemunha (água)	88,8 a

* Média de 6 repetições.

** As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

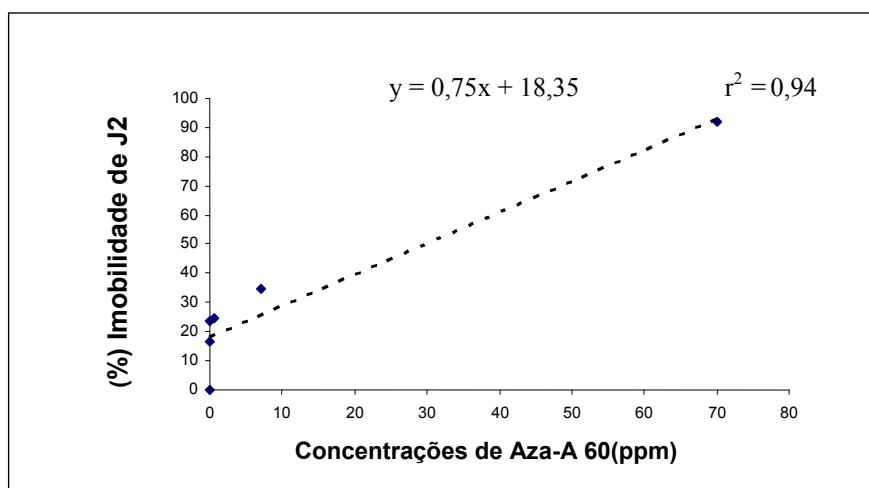


Figura 3: Curva da porcentagem de imobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, frente a diferentes concentrações do extrato de Aza-A 60.

A eficiência nematicida do extrato de Aza-A 60 sobre *Rotylenchulus reniformis* já foi demonstrada por SHARMA *et al.* (2003). Tais autores verificaram que houve redução de 50% da população de juvenis (J4) de *R. reniformis*, após 72 horas de exposição ao extrato concentrado de Aza-A 60 na dosagem de 151 ppm. Essa atividade nematicida foi atribuída principalmente à presença do conteúdo de Azadiractina A, bem como outros compostos presentes em menores concentrações como Azadiractina B e Azadiractina H.

Assim, a atividade nematicida de Aza-A 60 sobre os J2 de *H. glycines* permitiu confirmar a eficiência dos métodos de purificação utilizados por SILVA *et al.* (2004) e

SILVA e JHAM (2004), uma vez que não houve perda da atividade biológica das substâncias presentes no extrato testado se comparado ao extrato metanólico bruto (material de origem), cuja atividade já foi comprovada anteriormente.

3.4. Avaliação da mortalidade, *in vitro*, de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines* tratados com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60

Em praticamente todas as dosagens das substâncias testadas houve redução do número de J2 recuperados (Figura 4) e esse efeito foi inversamente proporcional ao aumento da dosagem aplicada, com as doses de 80 ppm mostrando-se mais efetivas. Similarmente, o percentual de mortalidade dos J2 foi maior quando as dosagens testadas foram de 80 ppm. Aqui também a taxa de nematóides mortos foi confirmada pelo teste com NaOH (1 mol/L). Nimbim e salanim a 80 ppm foram os compostos que apresentaram o maior potencial nematicida, causando 100 % de mortalidade dos juvenis tratados. O composto desacetilsalanim (Dsal), nas três dosagens testadas, foi o que apresentou numericamente o menor efeito nematicida.

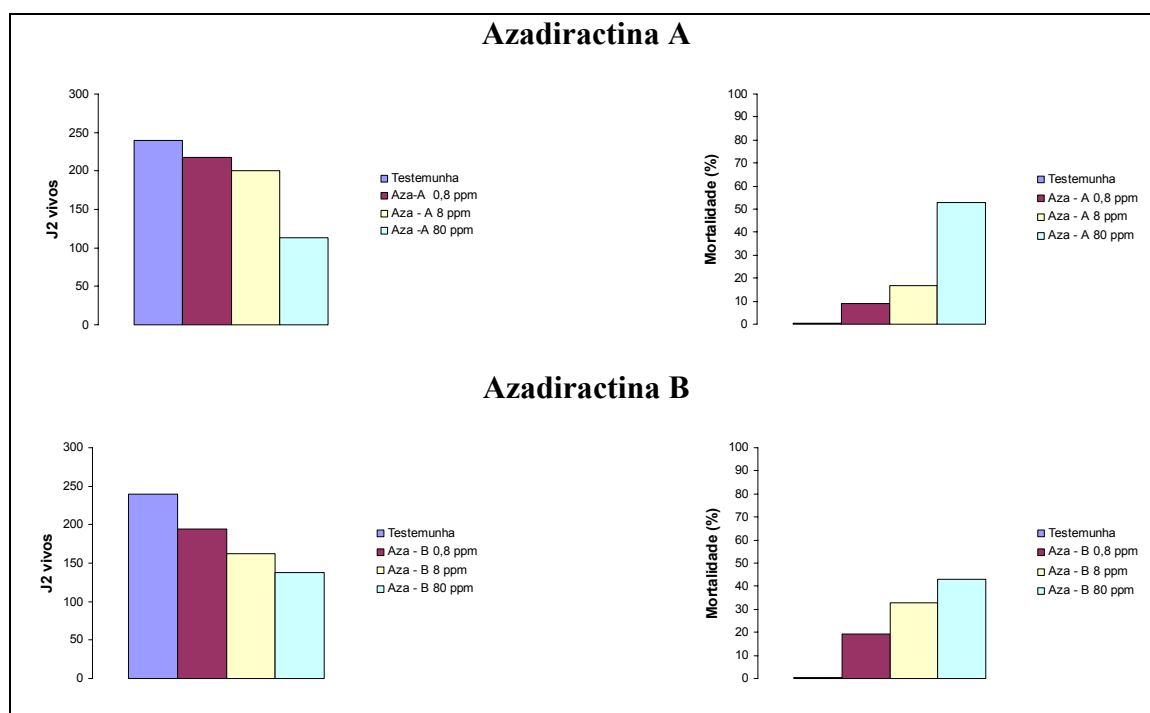
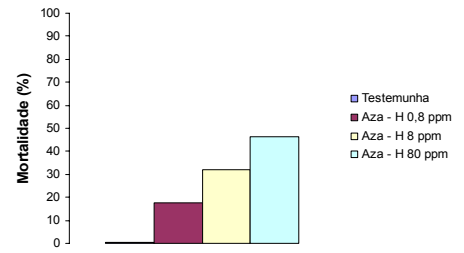
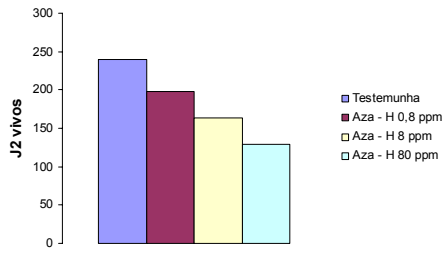
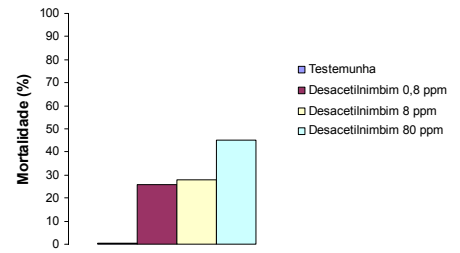
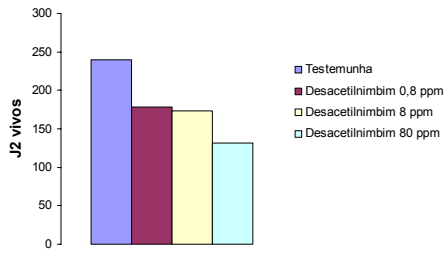


Figura 4: Número de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* recuperados pelo funil Baermann e percentagem de mortalidade após tratamento com triterpenóides puros em diferentes concentrações.

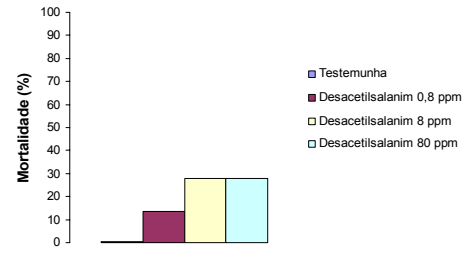
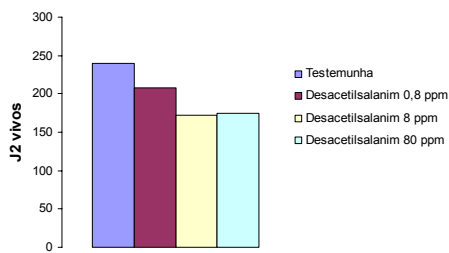
Azadiractina H



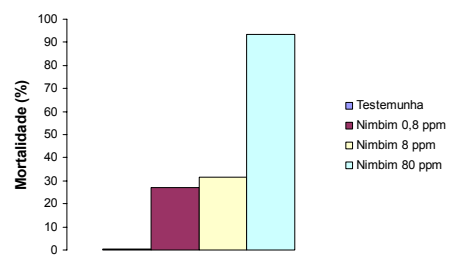
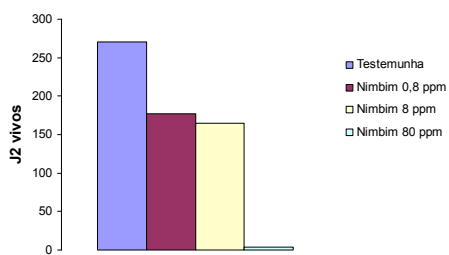
Desacetilnimbim



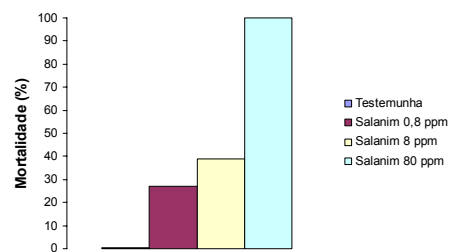
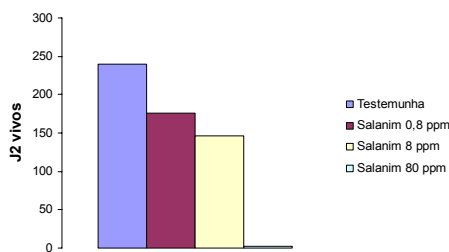
Desacetilsalanim



Nimbim



Salanim



A eficiência dos triterpenóides testados na mortalidade de *H. glycines* mostrou estar perfeitamente de acordo com o observado em literatura para outros nematóides, apesar de existir em poucos trabalhos descrevendo a ação nematicida de triterpenóides isolados de sementes de nim.

SHARMA *et al.* (2003) avaliando o efeito das substâncias azadiractina A (Aza-A), azadiractina B (Aza-B) e azadiractina H (Aza-H) na mortalidade, *in vitro*, de juvenis de *Rotylenchulus reniformis*, verificaram que o composto Aza-B foi o mais efetivo, sendo que a dosagem de 96,6 ppm reduziu 50% da população de nematóides. Para o mesmo efeito foram gastos 119,1 ppm para Aza-A e 141,2 ppm para Aza-H.

Em ensaios realizados, *in vitro*, sobre o nematóide *Meloidogyne incognita*, DEVAKUMAR *et al.* (1992) citados por SHARMA *et al.* (2003) verificaram atividade significativa de algumas azadiractinas e outros triterpenóides presentes em sementes de nim, como o nimbim e o salanim.

SIDDIQUI e ALAM (1993) relataram a ação nematicida de azadiractina A e nimbim sobre os nematóides *Meloidogyne incognita*, *Hoplolaimus indicus*, *Helicotylenchus indicus*, *Rotylenchulus reniformis*, *Tylenchorhynchus brassicae* e *Tylenchus filiformis*, e observaram que a mortalidade dos juvenis aumentava com o aumento das concentrações das substâncias testadas e com o período de exposição aos produtos. Tanto o nimbim quanto a azadiractina, na dosagem de 100 ppm, causaram 100 % de mortalidade após 48 horas de exposição dos juvenis, para todas as espécies avaliadas.

Assim, fica registrada a eficiente ação nematicida, principalmente de nimbim e salanim, sobre o nematóide de cistos da soja.

3.5. Avaliação do desenvolvimento de *Heterodera glycines*, em soja, após tratamento com triterpenóides isolados do extrato de Aza-A

60

As plantas inoculadas com juvenis tratados com os triterpenóides puros Aza-A, Aza-B, Aza-H, Dnim, Dsal, Nim e Sal a 80 ppm produziram menos fêmeas e ovos (P 0,05) que a testemunha (água). Não houve diferença significativa (P 0,05) entre os compostos avaliados (Tabela 7). Além disso, tais triterpenóides apresentaram uma redução média de 95% tanto para o número de fêmeas quanto para o número de ovos de *H. glycines* em relação à testemunha. Dessa forma, todas as substâncias testadas

apresentaram efeito nematicida considerável, afetando o desenvolvimento das fases do ciclo de vida do nematóide.

Tabela 7: Número de fêmeas e ovos de *Heterodera glycines* por sistema radicular de soja 'Conquista' após a inoculação dos juvenis de segundo estágio tratados com triterpenóides.

Triterpenóides a 80 ppm	Nº de Fêmeas*	Nº de Ovos*
Testemunha (Água)	40,5 a**	7792,2 a**
Azadiractina A	1,2 b	242,2 b
Azadiractina B	4,0 b	804,7 b
Azadiractina H	1,2 b	308,3 b
Desacetilnimbim	2,3 b	469,7 b
Desacetilsalanim	3,5 b	851,3 b
Nimbim	1,2 b	237,2 b
Salanim	1,3 b	285,8 b

* Média de 6 repetições.

** Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.6. Efeito de triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60 na eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*

Como esperado, a eclosão dos J2 de *H. glycines* caiu gradativamente ao longo dos 10 dias independente do tratamento usado (Tabela 8). De uma maneira geral, as substâncias Aza-A, Aza-B, Aza-H, Dnim, Dsal e Nim a 100 ppm, mostraram a mesma eficiência na redução da eclosão dos juvenis de segundo estágio, não diferindo estatisticamente entre si a 5 % de probabilidade, mas diferindo da testemunha. As percentagens de eclosão variaram de 46 à 62,5 % em relação à testemunha (Figura 5) e a substância salanim a 100 ppm mostrou ser mais eficiente (P 0,05) dentre as substâncias testadas, uma vez que apresentou uma menor porcentagem de eclosão (46%) dos J2.

Não se observou efeito nematostático das substâncias na concentração de 100 ppm, uma vez que a eclosão continuou caindo mesmo na ausência destas, isto é, na presença de água (Tabela 8).

Tabela 8 : Efeito de triterpenóides obtidos de sementes de nim na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*.

Triterpenóides a 100 ppm	<u>Nº de juvenis eclodidos*</u>						
	48h	96h	144h	192h	240 h	Total	336h (água)
Água	260,9 a	158,1 a	165,3 a	168,9 a	100,7 a	853,9 a	33,1 ^{n.s}
Azadiractina A	152,3 b	142,7 ab	91,0 bc	64,6 b	50,7 b	501,3 bc	45,0
Azadiractina B	137,3 b	119,9 b	105,7 bc	64,7 b	58,0 b	485,6 bc	52,2
Azadiractina H	149,1 b	132,9 ab	118,4 b	86,6 b	44,0 b	531,0 b	40,6
Desacetilnimbim	138,6 b	120,0 b	114,6 b	64,3 b	56,0 b	493,5 bc	47,9
Desacetilsalanim	162,6 b	122,0 b	102,6 bc	81,9 b	64,3 ab	533,4 b	52,4
Nimbim	163,9 b	113,1 b	98,1 bc	74,4 b	56,3 b	505,8 bc	47,3
Salanim	117,7 b	114,3 b	77,7 c	46,9 bc	43,0 b	399,6 c	41,0

* Média de 7 repetições.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

n.s. – Não significativo.

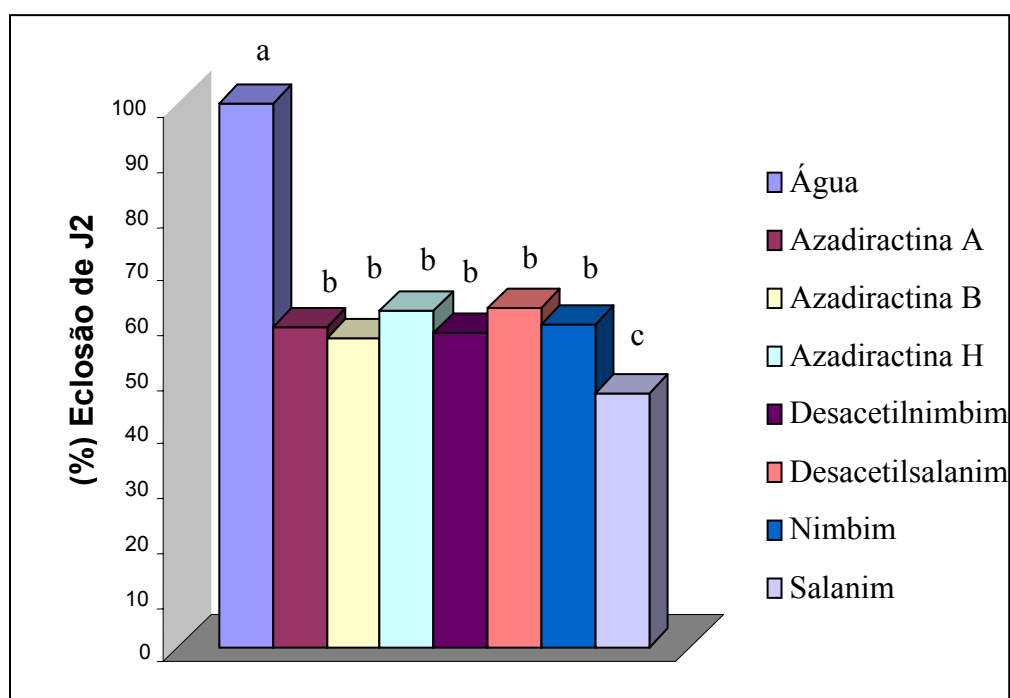


Figura 5: Percentagem de eclosão total de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* na presença de diferentes triterpenóides isolados do extrato de Aza-A 60, após 240 horas.

Um efeito nematocida médio em torno de 50% foi observado entre as substâncias estudadas. Essa redução na infecção de plantas de soja por *H. glycines* ainda pode permitir um rápido aumento na população no campo. Entretanto, a ação ovicida também

não tem sido observada com o uso de nematicidas convencionais (SPURR JÚNIOR, 1985) ou quando é observada, a taxa de redução tem sido baixa mesmo quando substâncias extraídas de plantas têm sido avaliadas (KHURMA e SINGH, 1997; OKA, et. al, 2000; AMARAL, et al., 2002; DIAS-ARIEIRA et al., 2003; SALGADO et al., 2003; SALGADO e CAMPOS, 2003). Entretanto, quando se somam os efeitos na eclosão e mortalidade de J2 de *H. glycines* pelo uso desses triterpenóides, principalmente pelos compostos salanim e nimbim, o nível de controle esperado é mais alto. Esse nível de controle em condições de campo ainda precisa ser avaliado.

DEVAKUMAR et al. (1985) testaram extratos acetônicos concentrados de sementes de nim, preparados por extração sequencial, na eclosão de *Meloidogyne incognita*, obtendo-se resultados em torno de 65% na inibição da eclosão dos juvenis em concentrações de 100 ppm dos extratos testados. Este efeito nematotóxico foi atribuído principalmente aos constituintes químicos triterpenóides (limonóides), presentes em alta concentração nesses extratos.

O efeito nematicida na eclosão dos juvenis de *Meloidogyne incognita* pelas substâncias azadiractina A e nimbim foi relatado por SIDDIQUI e ALAM (1993). Os autores verificaram que azadiractina A nas concentrações a 10, 100 e 1000 ppm apresentou uma percentagem de eclosão de 36, 30 e 12 %, respectivamente. Para o composto nimbim a percentagem de eclosão foi de 40, 35 e 19 %, nas concentrações a 10, 100 e 1000 ppm, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

1. Os extratos brutos aquoso (1/2 e 1/10 v/v) e metanólico (1000 ppm), mostraram-se potencialmente ativos na redução da mobilidade *in vitro* dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, além de terem afetado o desenvolvimento do nematóide no teste realizado *in vivo* (casa de vegetação). O extrato hexânico afetou apenas o desenvolvimento do nematóide no teste *in vivo*.
2. O extrato metanólico concentrado de sementes de nim (Aza-A 60) apresentou atividade nematicida sobre os J2 de *H. glycines* de até 92% quando se usou a concentração de 70 ppm.
3. Os triterpenóides azadiractina A, azadiractina B, azadiractina H, desacetilnimbim, nimbim e salanim demonstraram ser os mais tóxicos sobre J2 de *H. glycines*. Os compostos nimbim e salanim, ambos a 80 ppm, foram os mais ativos causando mortalidade de 98,3% e 99,9%, respectivamente, nos juvenis de segundo estágio de *H. glycines*.
4. As substâncias azadiractina A, azadiractina B, azadiractina H, desacetilnimbim, desacetilsalanim, nimbim e salanim a 80 ppm afetaram o desenvolvimento do nematóide no teste realizado *in vivo*, havendo uma redução média de 95% do número de fêmeas e ovos do nematóide em relação à testemunha.
5. Os compostos azadiractina A, azadiractina B, azadiractina H, desacetilnimbim, desacetilsalanim, nimbim e salanim a 100 ppm reduziram a eclosão dos juvenis (J2) de *H. glycines*. A inibição da eclosão variou de 46 a 62,5 % e não foi observada ação nematostática até 96 horas após o tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M. e AKHTAR, M. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). **Integrated Pest Management Reviews**, v.5, n.1, p.57-66, 2000.
- AMARAL, D.R., OLIVEIRA, D.F., CAMPOS, V.P., CARVALHO, D.A. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, v.26, n.1, p.43-48, 2002.
- CHEN, S.Y. e DICKSON, D.W. A Technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, n.1, p.117-121, 2000.
- DEBANAND, D., PRABAL, S., SAIKIA, L., DAS, D., SAIKIA, P. Effect of certain plant extracts on rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. **Journal of the Agricultural Science**, v.13, n.1, p.85-87, 2000.
- DEVAKUMAR, C., GOSWAMI, B.K., MUKERJEE, S.K. Nematicidal principals from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Part I. Screening of neem kernel fractions against *Meloidogyne incognita*. **Indian Journal of Nematology**, v.15, n.1, p.121-124, 1985.
- DIAS-ARIEIRA, C.R., FERRAZ, S., DEMUNER, A.J., FREITAS, L.G. Eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* frente a extratos químicos dos sistemas radiculares de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* cv. Guiné. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.1, p.87-92, 2003.
- EMBRAPA SOJA; **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil, 2005**. Londrina, PR, 2004. 239p.
- EUCLYDES, R.F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa - UFV, 1983. 59p.

- FERRAZ, S., VALLE, L.A.C., DIAS, C.R. Utilização de plantas antagonicas no controle do nematóide de cistos da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe). In: Artsigner (Eds). **O nematóide do cisto da soja: A experiência brasileira/SBN-Sociedade Brasileira de Nematologia**. Jaboticabal : SBN, 1999. cap.2, p.25-54.
- FRIGHETTO, R.T.S. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.271-274, 2000.
- GONZALEZ, J.A. e ESTEVEZ-BRAUN, A. Phytonematicidal activity of aromatic compounds related to shikimate pathway. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 58, p.193-197, 1997.
- GOVINDACHARI, T.R., NARASIMHAN, N.S., SURESH, G., PARTHO, P.D., GOPALAKRISHNAN, G. Insect antifeedant and growth-regulating activities of salannin and other c-seco limonoids from neem oil in relation to azadirachtin. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, n.8, p.1453-1461, 1996.
- GUPTA, P., SEBASTIAN, S., SOBITA, L.R., MISHRA, S.M. Use of neem cake in control of lesion nematode, cyst nematode and root knot nematode. **World Neem Conference**, India, n.65, p.621-625, 1993.
- JARVIS, A.P., MORGAN, E.D., EDWARDS, C. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. **Phytochemical Analysis**, v.10, p.39-43, 1999.
- JOHNSON, S. e MORGAN, E.D. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal of Chromatography A**, v.761, p.53-63, 1997a.
- JOHNSON, S. e MORGAN, E.D. Supercritical fluid extraction of oil and triterpenoids from neem seeds. **Phytochemical Analysis**, v.8, p.228-232, 1997b.
- KHURMA, U.R. e SINGH, A. Nematicidal potential of seed extracts: in vitro effects on juvenile mortality and egg hatch of *Meloidogne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Mediterranea**, v.25, p.49-54, 1997.

- KIMURA, Y., MORI, M.S., SUZUKI, A., MITSUI, Y. A rapid and simple method for assay of nematicidal activity and its application to measuring the activities of dicarboxylic esters. **Agriculture and Biological Chemistry**, v.45, p.249-251, 1981.
- LIMA, R.D. e FERRAZ, S. Biologia de *Meloidogyne exigua*. II. Desenvolvimento pós-embriogênico em cafeeiro 'Mundo Novo'. **Revista Ceres**, v.32, p.349-361, 1985.
- MARTINEZ, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica***. Natureza, Usos Múltiplos, Produção. IAPAR, Londrina, 2002. 142p.
- MENDES, M.L. O. Nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe 1952). In: ARANTES, N. E., SOUZA, P. I. M. (Eds.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.399-413.
- MOURÃO, S.A., ZANUNCIO, J.C., SILVA, J.C.T., JHAM, G.N. **Nim Indiano (*Azadirachta indica*) – Mil utilidades**. Viçosa – UFV, 2004. Boletim de Extensão n.47, 26p.
- NASCIMENTO, J.C. **Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* e quantificação de L-Dopa em três espécies de mucuna**. 1999. 124p. Tese (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Neem: A tree for solving Global Problems**. National Academy Press, Washington, D.C. 1992. cap.4, p.31-38.
- NOEL, G.R. History, distribution, and economics. In: RIGGS, R.D. & WRATHER, A. (Eds.). **Soybean cyst nematode. The American Phytopathology Society**. Minnesota:USA, 1992. p.1-13.
- OKA, Y., NACAR, S., PUTIEVSKY, E., RAVID, U., YANIV, Z., SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v.90, n.7, p.710-715, 2000.

- ROBBERS, J.E., EPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. Glicosídeos. In: ____ **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. 1 ed. São Paulo : Editorial Premier, 1997. cap.4, p.55-70.
- RODRIGUES, A.C., JHAM, G.N., OLIVEIRA, R.D. Mortality of the soybean cyst nematode in aqueous extracts of neem plant. **Nematologia Mediterranea**, v.29, p.173-175, 2001.
- SALGADO, S.M.L. **Produtos naturais no controle de fitonematóides**. 2001.120p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- SALGADO, S.M.L. e CAMPOS, V.P. Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.166-170, 2003.
- SALGADO, S.M.L., CAMPOS, V.P., CARDOSO, M.G., SALGADO, A.P.S. Eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* em óleos essenciais. **Nematologia Brasileira**, v.27, n.1, p.17-22, 2003.
- SCHMUTTERER, H. **The Neem Tree, source of unique products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes**. Cambridge; Toquio: VCH, 1995. 696p.
- SCRAMIM, S., FERNANDES, L.M.S., SILVA, H.P., YAHN, C.A. Avaliação biológica de extratos de 14 espécies vegetais sobre *Meloidogyne incognita* raça 1. **Nematologia Brasileira**, v.11, p.89-102, 1987.
- SHARMA, V., WALIA, S., KUMAR, J., NAIR, M.G., PARMAR, B.S. An efficient method for the purification and characterization of nematicidal Azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3966-3972, 2003.
- SIDDIQUI, M.A. e ALAM, M.M. Evaluation of Nematicidal Potential in Neem Allelochemicals. In: **Neem and environment**. SINGH, R.P.; CHARI, M.S.; RAHEJA, A.K., KRAUS, W. (Eds). New Delhi : Oxford and IBH Publishing Co., 1993. cap.72, p.669-678.

SILVA, J.F.V. e GARCIA, A. Nematóide de cisto da soja: Situação atual e perspectivas.

In: **I Encontro Regional sobre nematóide de Cisto da Soja -1996, Chapadão do Sul, MS**. Resumos. p.13-18. Dourados: EMBRAPA-CPAO/SEIVA, 1997. 31p. (EMBRAPA-CPAO. Documento, 12).

SILVA, J.C.T., JHAM, G.N., OLIVEIRA, R.D.L., BROWN, L. Isolation of Azadirachtin A from Neem (*Azadirachta indica*) seed concentrate by counter-current chromatography followed by preparative high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, submetido em 2004.

SILVA, J.C.T. e JHAM, G.N. Isolation of Six Minor Tetranortriterpenoids from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Seed Concentrate by Counter-current Chromatography Followed by Preparative High Performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis** , submetido em 2004.

SPURR JÚNIOR, H.W. Mode of action of nematicides. In: SASSER, J.N. e CARTER, C.C. (Eds). **An advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina State: North Carolina State University Graphics, 1985. cap.23, p.269-276.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A técnica de cromatografia em contracorrente (CCC), seguida por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) preparativa para o fracionamento e isolamento, respectivamente, dos triterpenóides azadiractina A, azadiractina B, azadiractina H, desacetilnimbim, desacetilsalanim, nimbim e salanim, presentes em Aza-A 60, mostrou ser eficiente uma vez que todos os compostos foram obtidos com elevado grau de pureza. Algumas vantagens no uso da CCC foram notadas, como rapidez e reprodutibilidade das análises, baixo consumo de solventes, boa resolução dos compostos e recuperação quantitativa da amostra injetada. Além disso, verificou-se a ocorrência do balanço de massas dos componentes fracionados, o que raramente é observado pelo uso de técnicas convencionais de cromatografia sólido-líquida aplicadas à purificação de produtos naturais complexos.

Os extratos brutos aquoso e metanólico de sementes de nim apresentaram atividade expressiva no controle de *H. glycines*, tendo afetado significativamente tanto a mobilidade dos juvenis de segundo estágio (J2), *in vitro*, como também o desenvolvimento das fases de vida do nematóide em plantas de soja. Atribuiu-se a atividade do extrato aquoso à possível presença de saponinas triterpenoídicas. Já para o extrato metanólico, a ação nematicida foi devido à presença de triterpenóides (limonóides). O extrato hexânico, por sua vez, afetou apenas o desenvolvimento do nematóide, indicando que devem existir outras substâncias nematicidas a serem exploradas.

O extrato de Aza-A 60 também mostrou ser potencialmente ativo, causando alta taxa de imobilidade dos J2 proporcionalmente às concentrações testadas. Este controle, da mesma forma como observado para o extrato metanólico bruto (material de origem), foi devido principalmente à presença de limonóides, confirmando a eficiência do método de purificação adotado nesse trabalho.

Todos os triterpenóides puros, isolados nesse trabalho, causaram mortalidade dos J2 nas dosagens testadas, tendo o nimbim e o salanim apresentado o efeito nematicida máximo ao se utilizar maiores concentrações. Observou-se também atividade nos ensaios *in vivo*, onde todos os compostos afetaram significativamente o desenvolvimento dos juvenis.

Com relação à eclosão dos J2 de *H. glycines*, todas as substâncias puras testadas apresentaram ação ovicida mediana, sendo o composto salanim o mais nematotóxico. Além disso, não se observou ação nematostática para nenhuma delas.

A atividade nematicida apresentada pelos triterpenóides puros, isolados nesse trabalho, permitiu concluir que a técnica pioneira de CCC/CLAE-FR revelou mais uma vez ser um eficiente método de purificação de compostos orgânicos diversos, em especial produtos naturais biologicamente ativos, uma vez que não houve perda de atividade dos triterpenóides isolados se comparados ao seu material de origem.

Assim, somados todos os efeitos na eclosão, mortalidade e desenvolvimento de J2 de *H. glycines*, causados pelos triterpenóides puros testados, o nível de controle esperado deverá ser maior, sendo que dentre essas substâncias, nimbim e salanim poderão apresentar um controle ainda mais significativo. Contudo, os efeitos da aplicação desses triterpenóides em condições de campo ainda necessitam ser estudados.

Para o nematóide de cistos da soja, devido à dificuldade de controle que os métodos convencionais têm apresentado, a descoberta de plantas que possuam alguma ação nematostática/nematicida, como por exemplo o nim, poderá fornecer novas alternativas para extensas áreas de plantio de soja que se encontram comprometidas devido aos elevados níveis populacionais deste nematóide.

ANEXOS

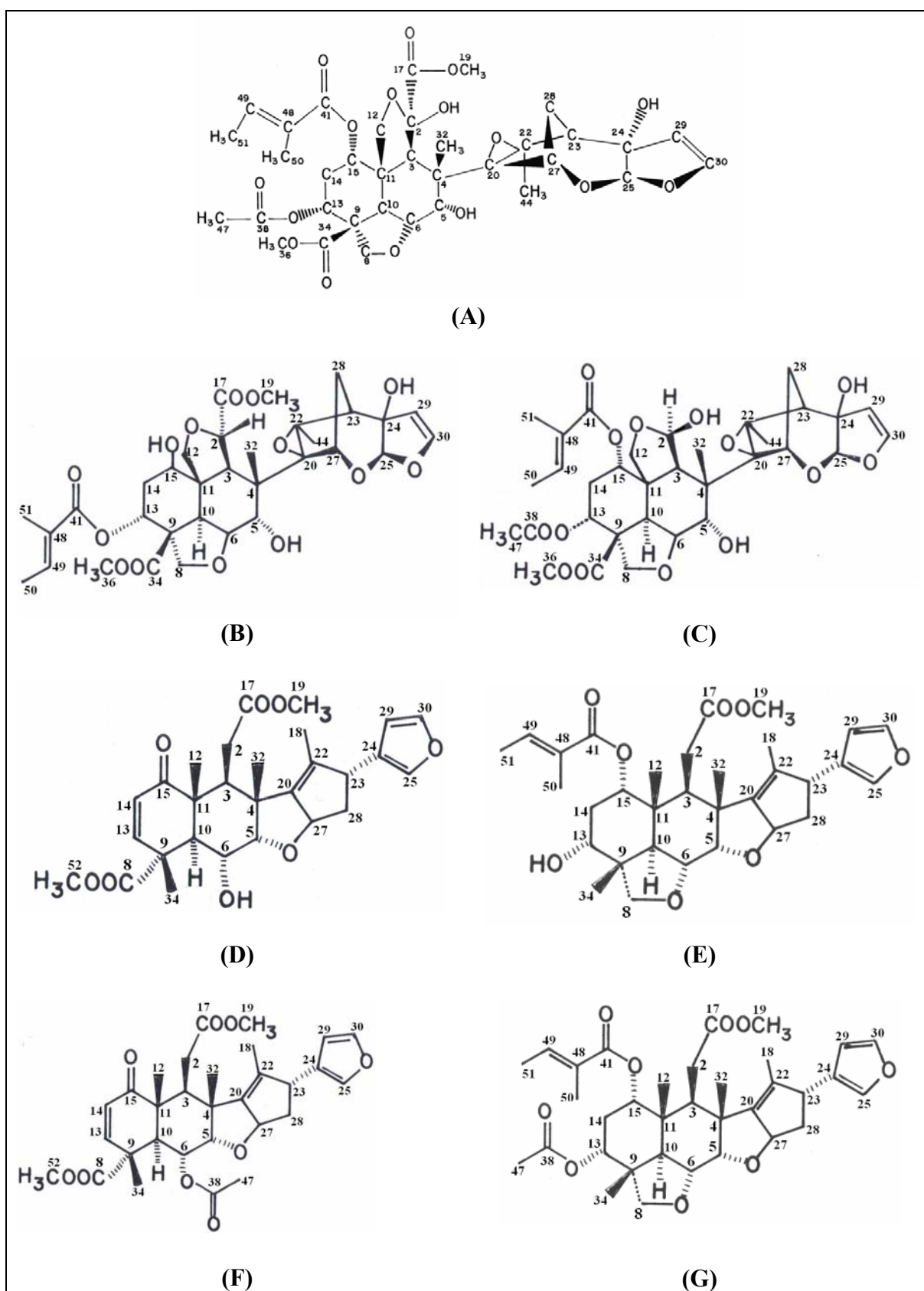


Figura 1: Estruturas de alguns tetranortriterpenóides isolados do nim: azadiractina A (A), azadiractina B (B), azadiractina H (C), desacetilnimbim (D), desacetilsalanim (E), nimbim (F) e salanim (G).

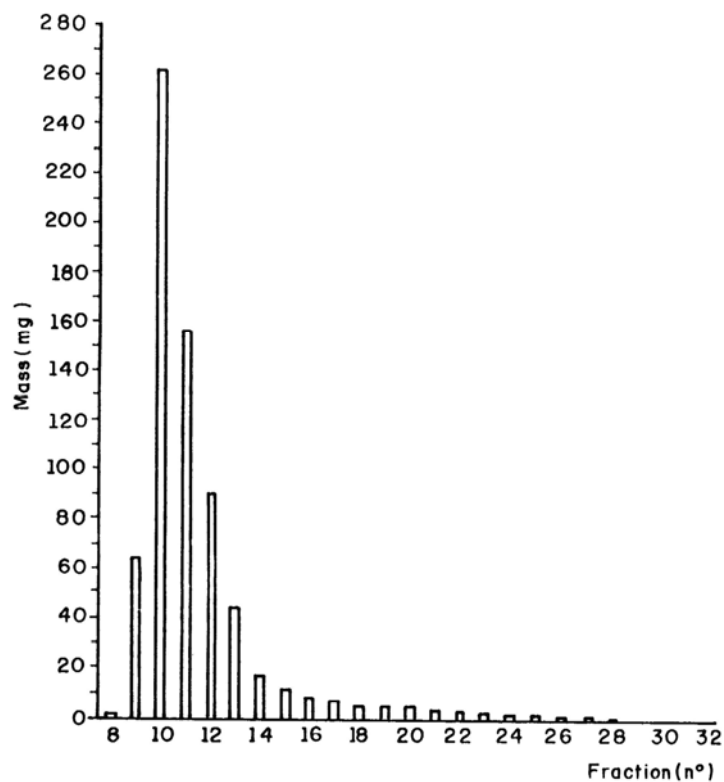


Figura 2: Mass histogram of the fractions obtained on countercurrent chromatography purification of neem seed concentrate (aza-A 60).

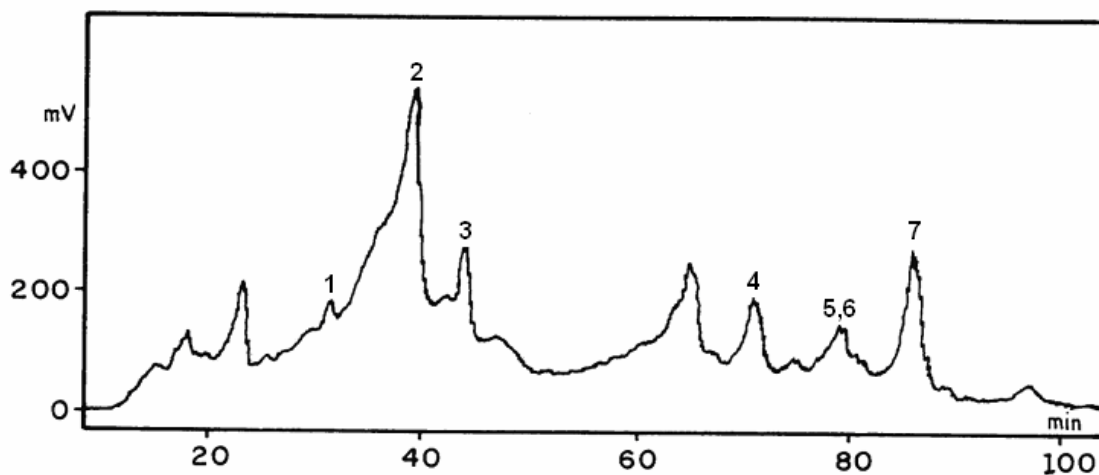


Figura 3: HPLC trace (preparative) obtained on analysis neem seed concentrate (aza-A 60). Peaks 1 to 7 are azadirachtin H, azadirachtin A, azadirachtin B, desacetylnimbim, desacetylsalanim, nimbim and salannin, respectively.

Table 1: ^{13}C NMR (at 75 MHz) chemical shifts (δ , ppm) of azadirachtin A (**A**) along with the literature [13] values in parentheses. Solvent : CDCl_3 , reference TMS.

Carbon Number ^a	δ (ppm) in azadirachtin A and literature values in parentheses	
2	104.4	(104.2)
3	44.9	(44.9)
4	45.6	(45.6)
5	74.6	(74.5)
6	74.0	(73.9)
8	73.2	(73.0)
9	53.0	(53.1)
10	37.2	(37.1)
11	50.3	(50.4)
12	69.3	(69.1)
13	67.2	(67.1)
14	30.0	(29.8)
15	70.7	(70.7)
17	173.6	(173.3)
19	52.7	(52.7)
20	70.1	(70.1)
22	68.8	(68.6)
23	48.9	(48.7)
24	83.8	(83.6)
25	109.0	(108.8)
27	76.70	(76.5)
28	25.2	(25.1)
29	107.6	(107.5)
30	147.3	(147.0)
32	21.5	(21.4)
34	172.0	(171.8)
36	52.6	(52.6)
38	169.6	(169.5)
41	166.4	(166.2)
44	18.5	(18.4)
47	21.1	(20.8)
48	128.9	(128.8)
49	137.7	(137.5)
50	14.3	(14.2)
51	12.2	(11.9)

^a See Fig.1 **A** (**anexos**) for carbon-atom numbering.

Table 2: ^{13}C NMR (at 50 MHz) chemical shifts (δ , ppm) of six compounds isolated along with the literature values in parentheses (Barrek *et al.*, 2004, for Azadirachtin-B (B) and Azadirachtin-H (C) and Johnson and Morgan, 1997, for Desacetylnimbin (D), Desacetylsalannin (E), Nimbin (F) and Salannin (G). (solvent : CDCl_3 , reference TMS).

Position	Azadirachtin B (B)	Azadirachtin H (C)	Desacetylnimbin (D)	Desacetylsalannin (E)	Nimbin (F)	Salannin (G)
2	79.7 (79.5)	100.9 (101.0)	34.5 (34.3)	30.4 (30.5)	34.1 (34.2)	30.9 (30.7)
3	43.9 (43.9)	48.6 (48.5)	39.3 (39.1)	39.4 (39.5)	38.4 (38.6)	39.6 (39.5)
4	44.2 (44.1)	43.3 (43.3)	47.5 (47.3)	48.9 (48.9)	46.9 (47.1)	49.3 (49.2)
5	73.8 (73.6)	76.5 (76.2)	87.1 (86.9)	85.8 (85.9)	83.9 (84.5)	85.9 (85.8)
6	74.4 (74.3)	74.0 (74.0)	66.4 (66.1)	72.1 (72.5)	68.6 (68.7)	72.8 (72.7)
8	73.4 (73.3)	70.0 (70.0)	175.7 (175.7)	77.5 (77.9)	174.2 (174.6)	77.9 (77.7)
9	53.4 (53.4)	52.3 (52.3)	47.9 (47.8)	44.1 (44.2)	47.7 (47.8)	42.9 (42.8)
10	35.3 (35.2)	37.0 (37.1)	43.8 (43.8)	38.5 (38.9)	41.5 (41.5)	40.1 (40.0)
11	51.3 (51.3)	47.7 (47.7)	47.7 (47.5)	40.5 (40.9)	47.8 (47.9)	40.8 (40.7)
12	69.5 (69.5)	73.0 (73.0)	17.1 (16.4)	15.1 (15.2)	16.6 (16.7)	15.3 (15.2)
13	67.8 (67.7)	67.1 (67.1)	148.2 (148.1)	70.5 (70.8)	147.9 (147.6)	71.5 (71.4)
14	32.2 (32.1)	31.0 (30.8)	126.6 (126.4)	30.5 (30.5)	126.0 (125.9)	27.8 (27.6)
15	71.5 (71.4)	72.3 (72.2)	202.3 (202.2)	72.8 (72.8)	201.0 (201.7)	71.5 (71.5)
17	174.2 (174.1)	* ^b -	173.8 (173.7)	172.1 (172.7)	173.1 (173.6)	172.9 (172.8)
19	53.0 (52.7)	* ^b -	51.8 (51.6)	51.3 (51.4)	51.5 (51.7)	51.8 (51.6)
20	69.1 (69.4)	73.1 (73.0)	147.0 (146.9)	146.5 (146.6)	146.0 (146.2)	146.8 (146.7)
22	66.6 (66.6)	69.7 (69.8)	135.1 (134.8)	134.9 (134.9)	134.9 (135.1)	135.1 (134.9)
23	49.1 (48.9)	48.3 (48.2)	49.8 (49.6)	49.3 (49.4)	49.2 (49.5)	49.6 (49.5)
24	83.8 (83.6)	83.7 (83.5)	127.0 (126.8)	127.1 (127.1)	126.5 (126.8)	127.3 (127.1)
25	109.3 (109.1)	108.5 (108.6)	139.2 (139.2)	138.8 (138.8)	139.0 (139.0)	143.1 (143.0)
27	76.3 (76.1)	77.5 (77.2)	87.6 (87.5)	87.8 (87.9)	87.0 (87.1)	88.1 (88.0)
28	25.2 (25.1)	25.2 (25.3)	41.6 (41.5)	41.3 (41.3)	41.6 (41.6)	41.6 (41.5)
29	107.6 (107.5)	107.5 (107.5)	110.6 (110.5)	110.7 (110.7)	110.1 (110.5)	110.8 (110.7)
30	146.8 (146.7)	147.5 (147.2)	143.3 (143.0)	142.9 (142.9)	143.0 (143.0)	138.9 (138.9)
32	21.2 (21.2)	20.6 (20.6)	17.6 (17.1)	16.9 (16.9)	16.5 (16.7)	17.1 (17.0)
34	173.6 (173.4)	173.5 (173.5)	16.5 (16.4)	19.6 (19.9)	17.0 (17.2)	19.8 (19.7)
36	52.4 (52.4)	52.7 (52.7)	* ^b -	* ^b -	* ^b -	* ^b -
38	* ^b -	169.8 (169.8)	* ^b -	* ^b -	170.5 (170.6)	170.6 (170.3)
41	167.1 (166.9)	166.4 (166.7)	* ^b -	166.1 (166.3)	* ^b -	166.9 (166.8)
44	18.3 (18.1)	18.6 (18.6)	13.1 (12.8)	13.0 (13.1)	12.7 (12.8)	13.2 (13.0)
47	* ^b -	21.0 (20.6)	* ^b -	* ^b -	20.9 (20.9)	21.0 (20.9)
48	128.6 (128.6)	128.8 (128.7)	* ^b -	128.5 (128.7)	* ^b -	129.2 (129.2)
49	138.9 (138.5)	138.1 (138.2)	* ^b -	137.5 (137.9)	* ^b -	137.4 (137.2)
50	14.7 (14.2)	14.5 (14.4)	* ^b -	12.1 (12.2)	* ^b -	14.5 (14.3)
51	12.1 (11.9)	11.9 (11.9)	* ^b -	14.3 (14.5)	* ^b -	12.0 (11.9)
52	* ^b -	* ^b -	53.2 (52.9)	* ^b -	53.0 (53.1)	* ^b -

^a See Fig.1 (B-G) (anexos), for carbon-atom position.

^b Carbon not present in the structure.

Azadiractina A (Aza-A)

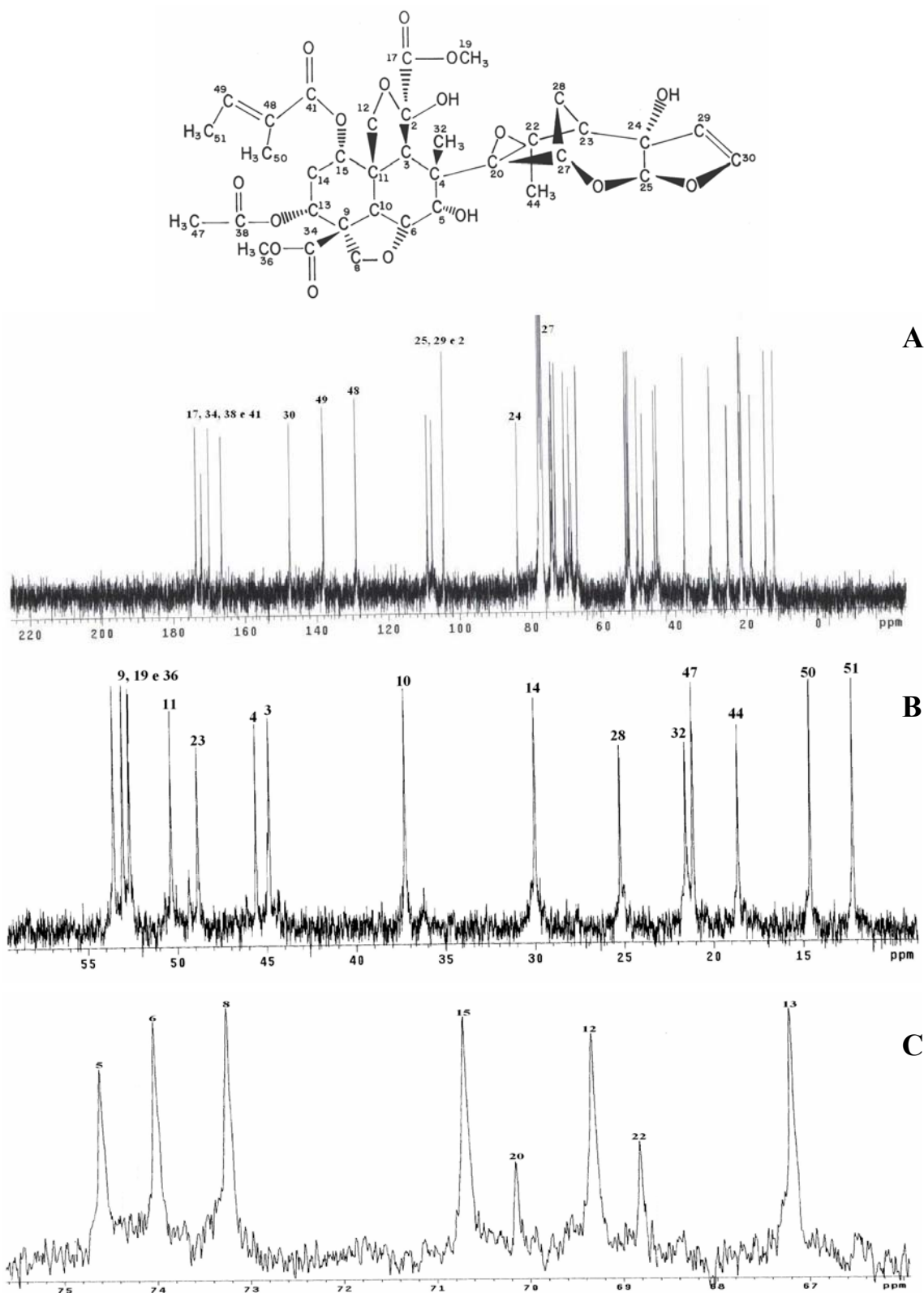
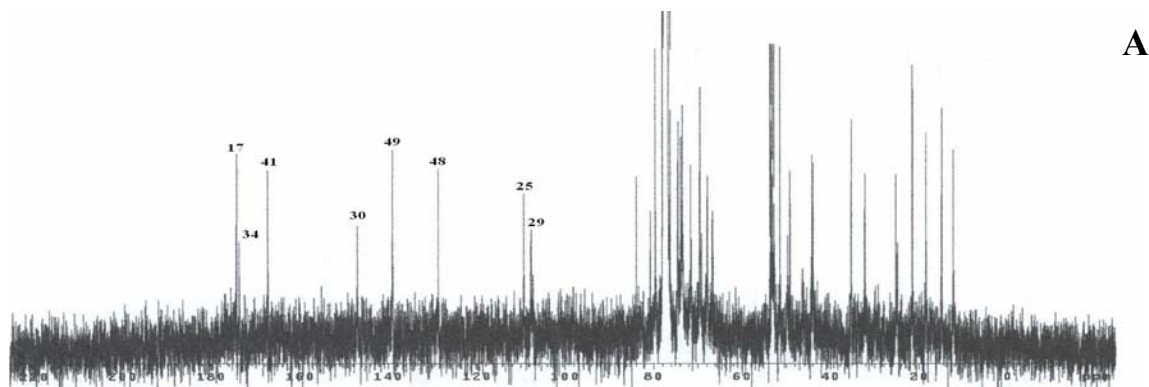
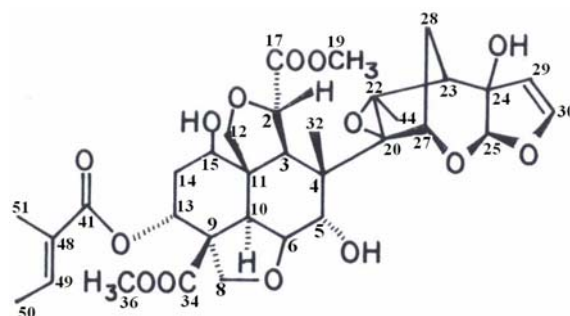
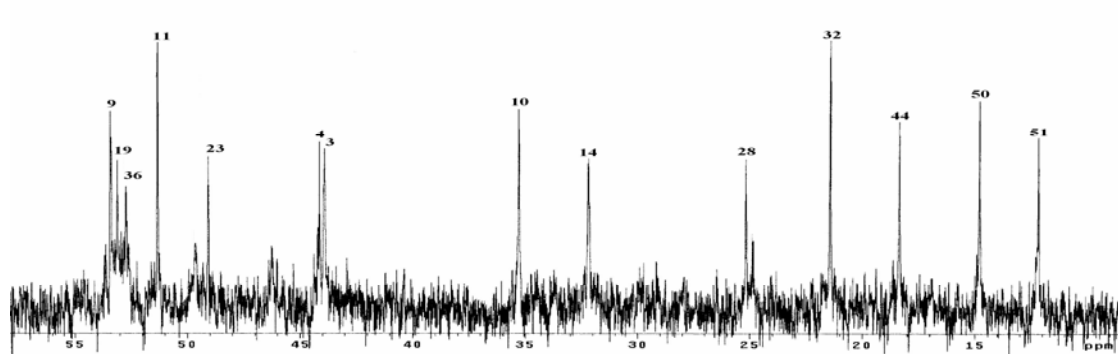


Figura 4 : A) Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto Aza-A.
B) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 10 a 60 ppm) de Aza-A.
C) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 67 a 75 ppm) de Aza-A.

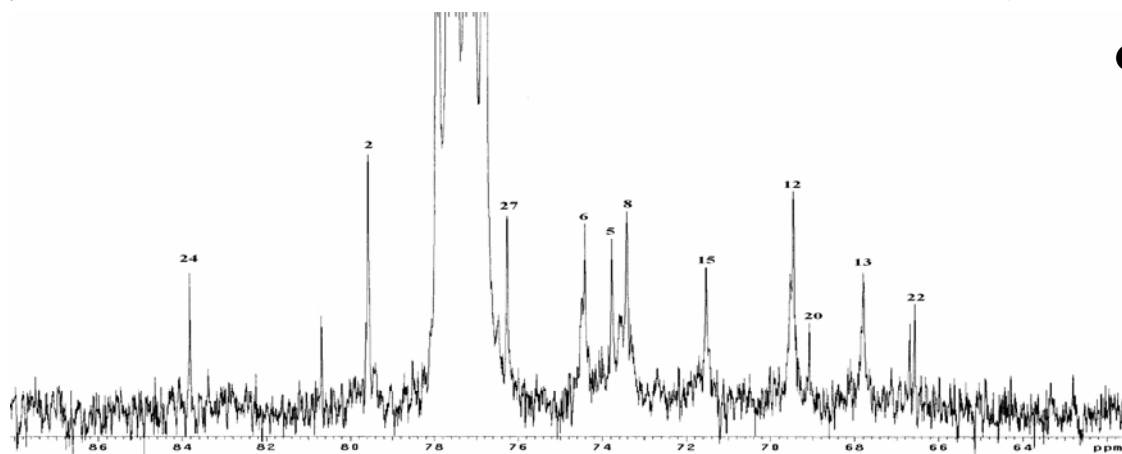
Azadiractina B (Aza-B)



A



B



C

Figura 5: A) Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto Aza-B.
B) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 10 a 55 ppm) de Aza-B.
C) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 64 a 86 ppm) de Aza-B.

Azadiractina H (Aza - H)

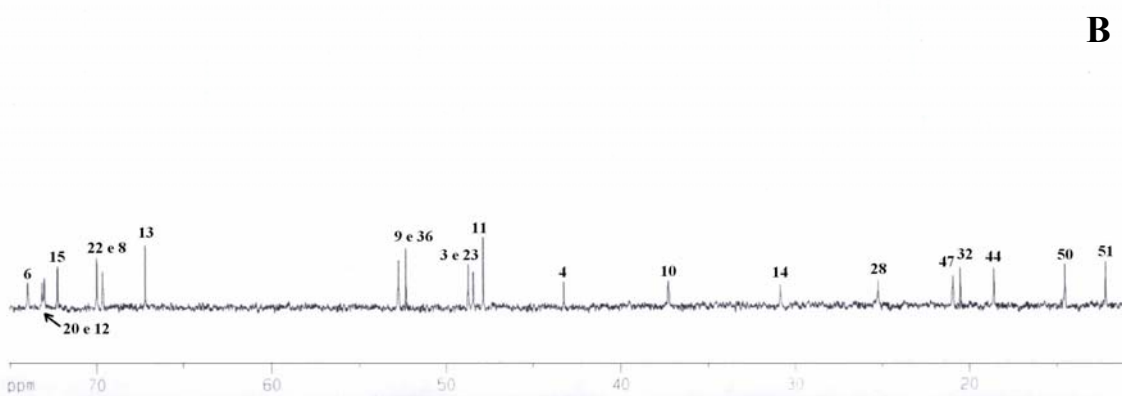
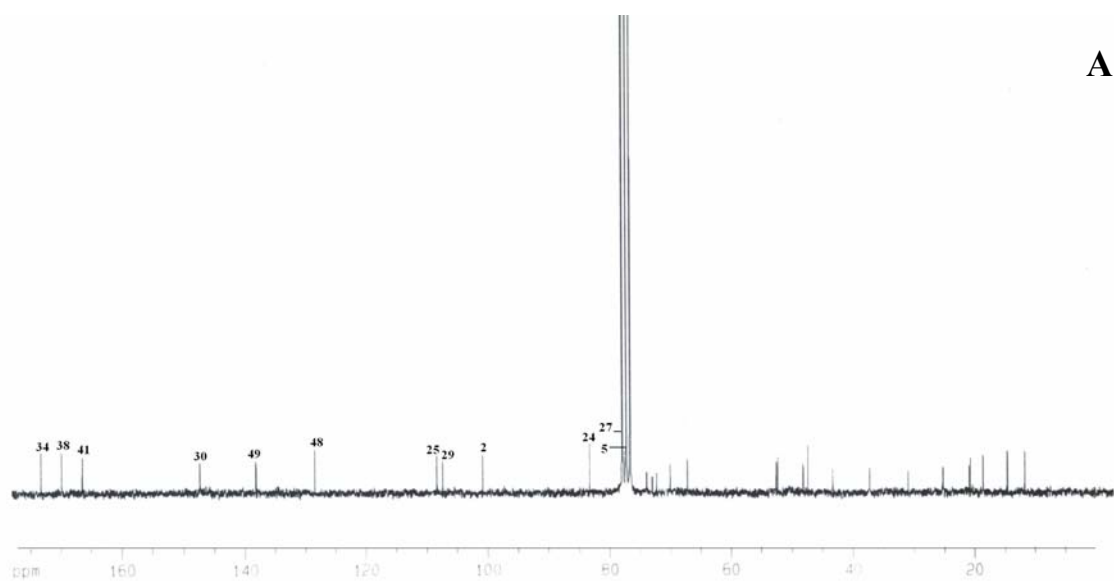
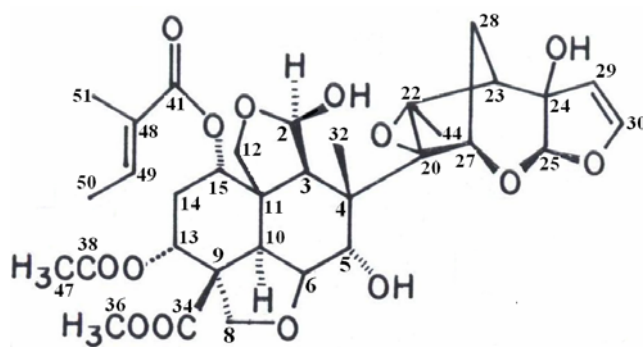
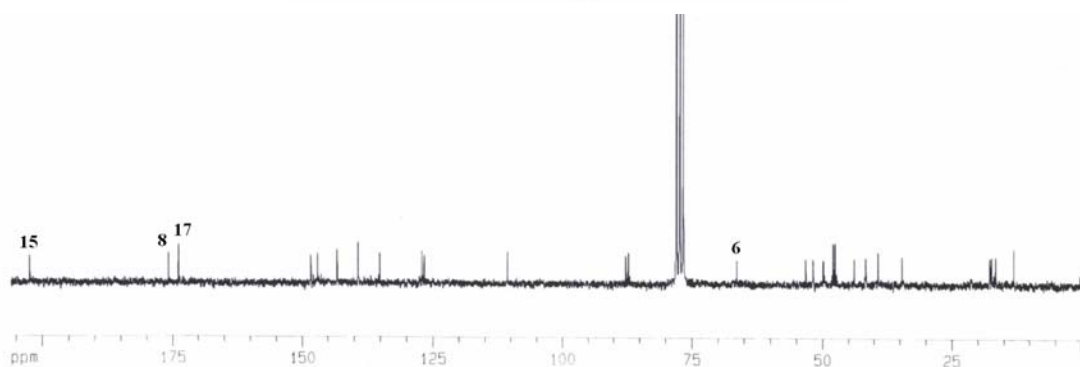
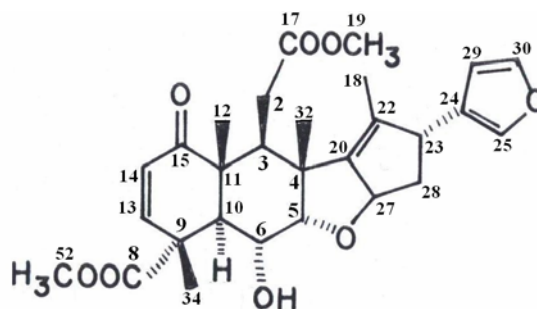


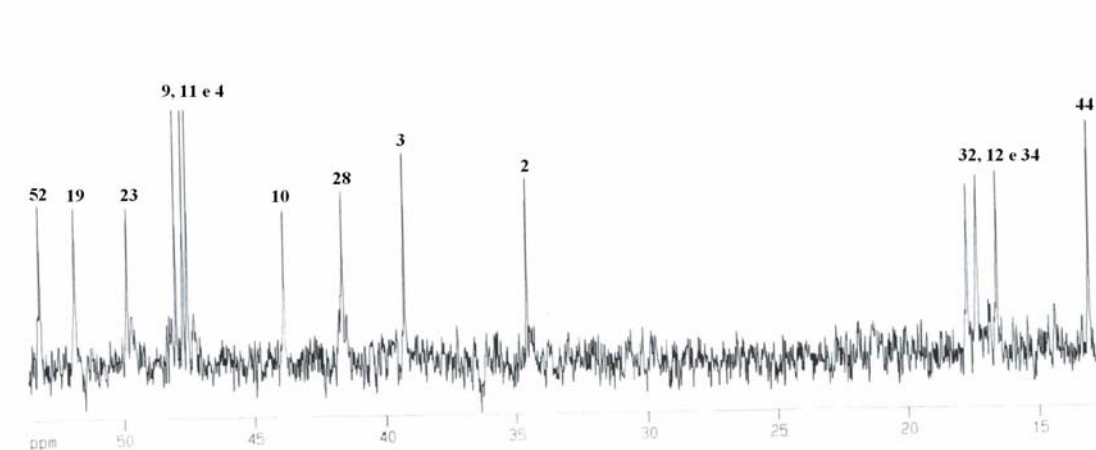
Figura 6: A) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto Aza-H.

B) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 10 a 75 ppm) de Aza-H.

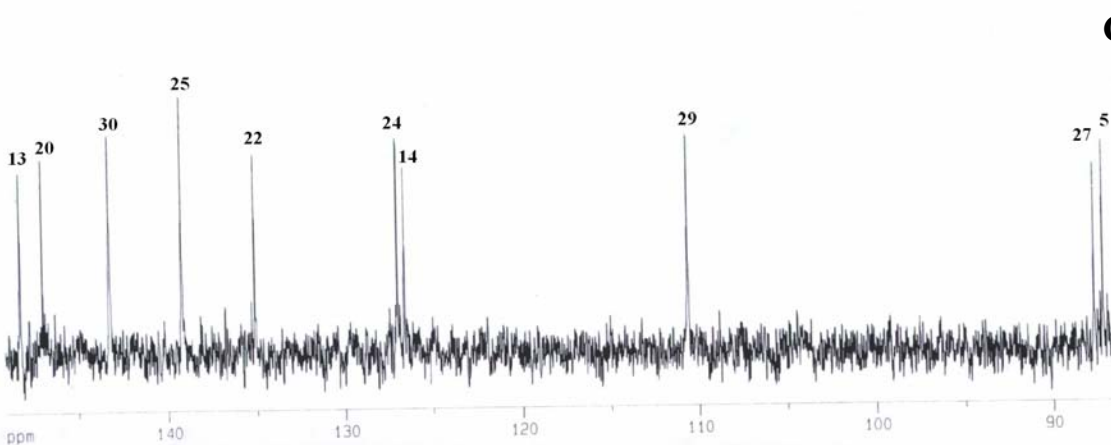
Desacetilnimbim (Dnim)



A



B



C

Figura 7: A) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto desacetilnimbim.
B) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 13 a 55 ppm) de Dnim.
C) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 87 a 149 ppm) de Dnim.

Salanim (Sal)

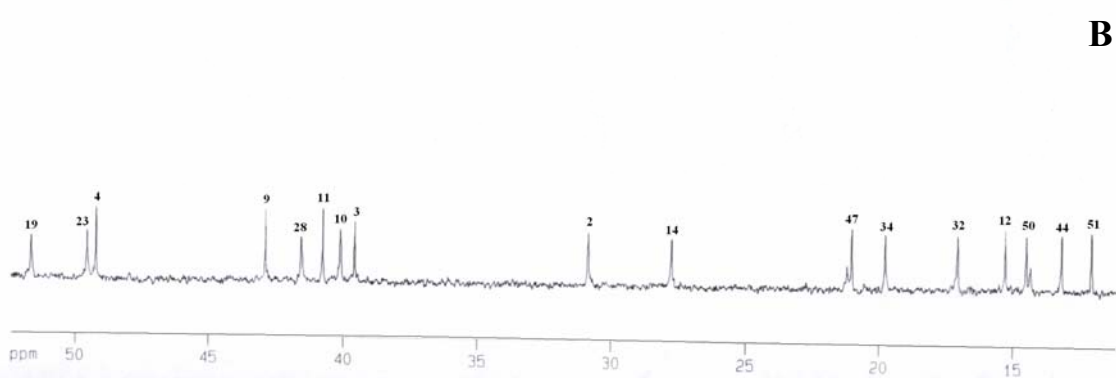
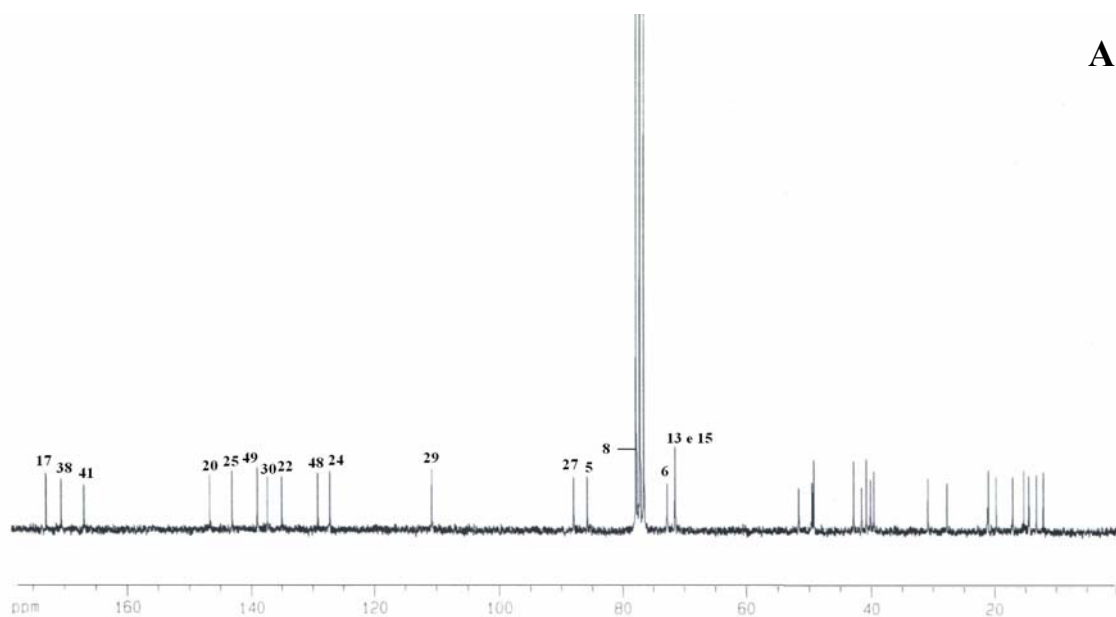
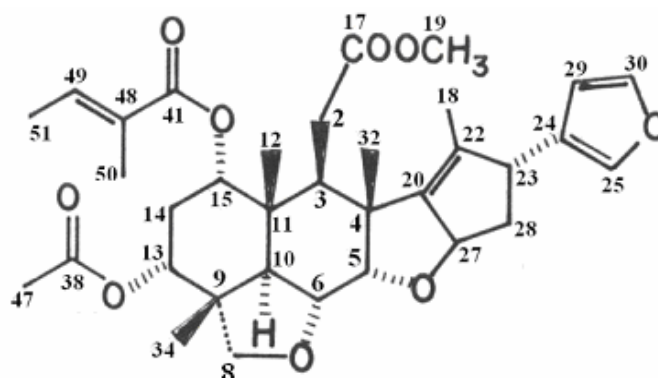


Figura 8: A) Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto salanim. B) Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (δ 10 a 55 ppm) de Sal.