

FERNANDO FONTES BARCELOS

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Mucuna aterrima*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do Título de “*Magister
Scientiae*”

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
SETEMBRO - 1997

FERNANDO FONTES BARCELOS

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Mucuna aterrima*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do Título de “*Magister
Scientiae*”

APROVADA: 30 de janeiro de 1997.

Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Conselheiro)

Prof^a Maria Amélia dos Santos
(Conselheira)

Prof^a Célia Regina A. Maltha

Prof^a Maria Eliana L. R. de Queiroz

Luiz Cláudio de A. Barbosa
(Orientador)

A Deus, por toda a minha vida.
Aos meus pais, Abel e Aldete, por tudo.
À minha esposa, Rosilene, pelo amor.
À minha filha, Fernanda, pela felicidade.
Aos meus sogros, Wilson e Senira, pelo apoio.
Em especial, aos meus avôs (*in memoriam*),
Afonso Barcelos e Antônio Luciano da Silva.

A Vida é uma oportunidade, agarre-a.
A Vida é uma beleza, admire-a.
A Vida é ventura, saboreie-a.
A Vida é um sonho, faça dele realidade.
A Vida é um desafio, enfrente-o.
A Vida é um dever, cumpra-o.
A Vida é um jogo, jogue-o.
A Vida é preciosa, cuide bem dela.
A Vida é uma riqueza, conserve-a.
A Vida é amor, goze-o.
A Vida é um mistério, penetre-o.
A Vida é uma promessa, cumpra-a.
A Vida é uma tristeza, supere-a.
A Vida é um hino, cante-o.
A Vida é um combate, aceite-o.
A Vida é uma tragédia, enfrente-a.
A Vida é uma aventura, ouse-a.
A Vida é uma felicidade, mereça-a.
A Vida é a Vida, defenda-a e viva-a bem.

Madre Teresa de Calcutá.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela orientação segura, pelos ensinamentos preciosos e pela amizade.

Ao Professor Antônio Jacinto Demuner, pela amizade e pelos conselhos inteligentes.

À Professora Maria Amélia dos Santos, por toda a participação neste trabalho e pelas sugestões.

Às Professoras Célia Regina Alvares Maltha e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela amizade e pelas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao Professor Eduardo Euclides de Lima e Borges, do Departamento de Engenharia Florestal, e à Pesquisadora Inês Channel, do BIOAGRO, pela cessão de seus laboratórios para a utilização dos cromatógrafos a gás.

Ao Técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) Antônio Carlos da Silva (“Antônio Conjunto”), pela amizade, dedicação e valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Professor Efraim Lázaro Reis, pela amizade e por ter sido meu primeiro orientador em pesquisa, como estudante de Iniciação Científica.

À Estudante de Iniciação Científica Andreia Varmes Fernandes, pela amizade e dedicação.

Aos amigos Adilson, Almir, Gélson, Larissa, Márcia, Mauro César, Patrícia e Vanderlúcia, pela grande amizade de todas as horas e pelo prazeroso convívio.

Aos demais colegas do LASA, em especial a Flávia, Jeferson, Leonardo, Mauro Longue, Remilson, Ricardo e Vágner, pela amizade e convivência harmoniosa.

Aos amigos Fábio, Jorge e Kléber, pela amizade.

À secretária da Pós-Graduação Solange Starling, pela dedicação e pelo auxílio.

A todos os amigos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

A toda a minha família, que sempre me deu força nesta jornada, com muito carinho, em especial aos meus irmãos Adriana e Fábio e às minhas avós Antera e Antônia.

Finalmente, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização e melhoria deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDO FONTES BARCELOS, filho de Abel Fontes da Silva e Aldete Barcelos da Silva, nasceu em 3 de fevereiro de 1971, na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Em 1990 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde graduou-se Bacharel em Química em agosto de 1994.

Em setembro de 1994 iniciou os estudos no curso de Mestrado em Agroquímica, nessa mesma universidade (UFV), concluindo-o com a defesa de tese em 30 de janeiro de 1997.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
EXTRATO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nematóides	1
1.2. Nematicidas	5
1.3. <i>Mucuna</i> sp.	10
1.3.1. Características e utilização de <i>Mucuna</i> sp.	10
1.3.2. Composição química de <i>Mucuna</i> sp.	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Ensaio biológico preliminar - ensaio das placas de incubação	24
2.1.1. Preparo dos extratos a quente e a frio de mucuna-preta	24
2.1.2. Preparo das emulsões para os ensaios biológicos	24
2.1.3. Obtenção das massas de ovos do fitonematóide <i>Meloidogyne</i> <i>incognita</i> raça 3	25

	Página
2.1.4. Montagem do ensaio biológico preliminar	25
2.2. Isolamento dos constituintes da mucuna-preta (<i>Mucuna aterrima</i>)	26
2.2.1. Análise dos constituintes inorgânicos	29
2.2.2. Análise de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa, das frações obtidas	34
2.2.2.1. Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando metóxido de sódio/metanol	34
2.2.2.2. Esterificação de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando BF ₃ /metanol	34
....	
2.2.3. Análise da fração RPB(1)160-191	35
2.3. Análise de açúcares, por CCD, das frações RPE(1) e RPE(2)	36
2.4. Ensaio biológicos - ensaio do tubo Invertido	37
2.4.1. Preparo das amostras	37
2.4.2. Preparo da suspensão de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3	37
2.4.3. Montagem dos ensaios biológicos	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. Ensaio das placas de incubação - avaliação do efeito dos extratos brutos da mucuna-preta sobre a eclosão de massas de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3	40
3.2. Isolamento dos constituintes da mucuna-preta (<i>Mucuna aterrima</i>): caracterização e identificação	43
3.2.1. Constituintes inorgânicos	43
3.2.2. Ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos	46
3.2.2.1. Mistura de ésteres de ácidos graxos	46
3.2.2.2. Mistura de ácidos graxos	50
3.2.3. Mistura de β-sitosterol e estigmasterol	57
3.2.4. Alantoína	61

	Página
3.2.5. Álcool	66
3.2.6. Daucosterol	68
3.3. Análise de açúcares, por CCD, das frações RPE(1) e RPE(2)	76
3.4. Ensaio do tubo invertido - avaliação da atividade nematicida das amostras sobre juvenis de <i>meloidogyne incognita</i> raça 3	77
4. RESUMO E CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Ensaio das placas de incubação - Número de juvenis de 2º estágio eclodidos das massas de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 após exposição aos extratos brutos de mucuna-preta	41
2. Constituintes químicos isolados do caule e da raiz da mucuna-preta	44
3. Porcentagem de sódio e potássio nos sais de nitrato isolados da mucuna-preta, determinados por espectrofotometria de emissão atômica	45
4. Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e os da amostra CP(2)1-19	48
5. Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e das amostras	51
6. Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e os da fração RPB(2)21-50	56
7. Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) obtidos para RPS ₁	64
8. Dados de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) obtidos para RPS ₁ e comparação com valores de $\delta^{13}\text{C}$ da literatura	64

	Página
9. Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191 e comparação com valores de $\delta^{13}\text{C}$ da literatura ...	70
10. Tempos de retenção dos padrões de carboidratos (na forma de alditol acetato) e o tempo de retenção da fração RPB(1)160-191 hidrolisada (fase aquosa)	74
11. Número de juvenis de 2º estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 recuperados ao final do ensaio do tubo invertido com amostras na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com inóculo inicial de 400 nematóides	78
12. Análise de variância do teste do tubo invertido (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	79
13. Número de juvenis de 2º estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 recuperados ao final do ensaio do tubo invertido com amostras na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com inóculo inicial de 400 nematóides	82
14. Análise de variância do teste do tubo invertido (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	83

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Raízes de tomateiro infectadas por <i>Meloidogyne</i> , apresentando galhas e massas de ovos	4
2. Tubérculos de batata fortemente desfigurado por nematóides do gênero <i>Meloidogyne</i>	5
3. Vista de uma plantação de mucuna-preta (grande produção de massa verde)	11
4. Esquema da montagem utilizada para o ensaio das placas de incubação	26
5. Esquema da coluna filtrante para o fracionamento do extrato etanólico do caule da mucuna-preta	28
6. Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico do caule da mucuna-preta	30
7. Fluxograma do fracionamento do material sobrenadante [RPE(1)] do extrato etanólico da raiz da mucuna-preta	31
8. Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do material decantado [RPE(2)] do extrato etanólico da raiz da mucuna-preta	32

	Página
9. Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato benzênico da raiz da mucuna-preta	33
10. Esquema da montagem utilizada no ensaio do tubo invertido	39
11. Porcentagem de inibição dos extratos brutos de mucuna-preta sobre a eclosão de juvenis de 2 ^o estágio das massas de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3, em relação ao branco	42
12. Espectro no infravermelho da fração CPS ₁	45
13. Espectro no infravermelho da fração RPS ₂	46
14. Espectro no infravermelho da fração CP(2)1-19	47
15. Cromatograma dos ésteres metílicos da fração CP(2)1-19	49
16. Espectro no infravermelho da fração CP(3)111-179	51
17. Cromatogramas dos ésteres metílicos das frações CP(2)20-40 (A), CP(3)111-179 (B) e CP(3)180-265 (C)	52
18. Espectro no infravermelho da fração RPB(2)21-50	54
19. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da fração RPB(2)21-50	55
20. Cromatograma dos ésteres metílicos da fração RPB(2)21-50	55
21. Espectro no infravermelho da fração CP(3)59-110	59
22. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da fração CP(3)59-110	60
23. Espectro de massas de CP(3)59-110	60
24. Espectro no infravermelho da fração RPS ₁	63
25. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da fração RPS ₁	65
26. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da fração RPS ₁	65
27. Espectro no infravermelho da fração RPE(5)289-325	67
28. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da fração RPE(5)289-325	67
29. Espectro no infravermelho da fração RPB(1)160-191	69

	Página
30. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191	71
31. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191, compreendendo a região de δ 13,0 a 21,0 (a) e δ 23,0 a 32,0 (b)	71
32. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191, compreendendo a região entre δ 34,0 e 40,0	72
33. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191, compreendendo a região de δ 43,0 a 51,0 (a) e δ 59,0 a 76,0 (b)	72
34. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191	73
35. Cromatograma dos padrões de açúcares (na forma de alditol acetato) (A) e da fração RPB(1)160-191 hidrolisada (fase aquosa) (B)	75
36. Resultado da corrida cromatográfica para determinação dos carboidratos presentes no extrato etanólico (placa de sílica-gel)	76
37. Porcentagem de mortalidade apresentada pelos tratamentos sobre o número de juvenis de 2º estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3, em relação ao branco, no ensaio do tubo invertido a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	79
38. Porcentagem de mortalidade apresentada pelos tratamentos sobre o número de juvenis de 2º estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3, em relação ao branco, no ensaio do tubo invertido a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	83

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CC	Cromatografia em coluna
R_f	Fator de retenção em cromatografia de camada delgada
IV	Infravermelho
δ_s	Deformação angular simétrica no plano
ν	Estiramento
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
δ	Deslocamento químico
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
s	Simpleto
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
t	Tripleto
m	Multipleteo
J	Constante de acoplamento escalar

m/z	Razão entre a massa e a carga de um fragmento
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
TMS	Tetrametilsilano
Hex	Hexano
EE	Éter etílico
AE	Acetato de etila
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
THF	Tetraidrofurano
DCM	Diclorometano
G.L.	Graus de liberdade

EXTRATO

BARCELOS, Fernando Fontes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 1997. **Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna aterrima***. Professor Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Professores Conselheiros: Antônio Jacinto Demuner e Maria Amélia dos Santos.

As plantas do gênero *Mucuna* têm sido largamente utilizadas na agricultura, principalmente para eliminação de plantas daninhas, adubação verde e supressão da população de nematóides, levando à redução das aplicações de agroquímicos. Porém, poucos estudos fitoquímicos foram realizados com plantas deste gênero, e os compostos que conferem atividade nematicida a estas plantas ainda não foram caracterizados, apesar da reconhecida atividade e de sua vasta utilização. Em face disso, este trabalho teve por objetivo comprovar a eficiência da mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) no controle do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3, através de ensaios biológicos *in vitro* com seu extrato bruto, bem como de realizar o estudo químico do caule e da raiz desta planta, buscando a identificação dos princípios ativos responsáveis pela atividade nematicida e, ou, nematostática. Assim, foram obtidos os extratos etanólicos a quente e a frio da raiz e da parte aérea da mucuna-preta, sendo estes submetidos a ensaios

biológicos de atividade nematicida diante de *Meloidogyne incognita* raça 3. Todos os extratos apresentaram atividade de inibição da eclosão de ovos deste nematóide, e o extrato da raiz obtido a frio mostrou-se mais eficiente. Com base nesses resultados foram utilizados extratos etanólico do caule e etanólico e benzênico da raiz para o estudo químico. Estes foram submetidos a análises por CCD e fracionamentos sucessivos por cromatografia em coluna, proporcionando o isolamento dos seguintes compostos: do caule - $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (4,9 %, em massa), ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos (6,2 %) e β -sitosterol + estigmasterol (0,5 %); e da raiz - $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (1,0 %), ácidos graxos (0,7 %), β -sitosterol + estigmasterol (2,8 %), alantoína (2,3 %), β -sitosterol glicosilado (daucosterol) + estigmasterol glicosilado (0,15 %) e, ainda, um álcool não-identificado (0,2 %). Estes compostos e os padrões de L-dopa, ácido caprílico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linolênico, palmitato de metila e estearato de metila foram submetidos a ensaios biológicos, utilizando a técnica do tubo invertido. A análise dos resultados mostrou que os compostos, em uma concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, que causaram maior mortalidade sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3 foram o β -sitosterol + estigmasterol (74,4 % de mortalidade, em relação ao branco), o álcool não-identificado (69,7 %), $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (68,3 %) e a L-dopa (64,4 %).

ABSTRACT

BARCELOS, Fernando Fontes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 1997. **Isolation and evaluation of nematicidal activity of chemical constituents from *Mucuna aterrima***. Adviser: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Committe members: Antônio Jacinto Demuner and Maria Amélia dos Santos.

Plants of genus *Mucuna* have been largely used in agriculture aiming at the elimination of weeds, green manuring and suppression of nematode populations, causing the agrochemicals applications to reduce. Just a few phytochemical studies have been carried out with plants of this genus and the compounds giving these plants nematicidal activity haven't been yet characterized, although its recognized activity and large utilization. So, the objective of this work was to confirm the efficiency of velvetbean (*Mucuna aterrima*) in controlling the phytonematode *Meloidogyne incognita* strain 3, through the *in vitro* biological assays with its crude extract, as well as to conduct a chemical study on the stems and roots of this plant in order to identify the active principles responsible for nematostatic and/or nematicidal activity. The ethanolic extracts were obtained by a hot-and-cold process from roots and the aerial part of velvetbean. These extracts were submitted to biological assays for nematicidal activity on *Meloidogyne incognita* strain 3. All extracts were active

in inhibiting eclosion of the juveniles' eggs whereas the root extract, which was obtained by a cold process, showed to be more effective. Based on these results, it were used both ethanolic extracts from stems and the ethanolic and benzenic extracts from roots for chemical study. These extracts were submitted to TLC analysis and successive fractionation in column chromatography, providing the isolation of the following compounds: from stems - $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (4,9 %, in mass), fatty acids and esters of fatty acids (6,2 %) and β -sitosterol + stigmasterol (0,5 %); and from roots - $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (1,0 %), fatty acids (0,7 %), β -sitosterol + stigmasterol (2,8 %), allantoin (2,3 %), β -sitosterol-D(+)-glucoside (daucosterol) + stigmasterol-D(+)-glucoside (0,15 %) and also a no-identified alcohol (0,2 %). These compounds and the L-dopa, caprylic acid, palmitic acid, stearic acid, linolenic acid, methyl palmitate and methyl stearate standards were submitted to biological assays by the inverted tube method. The results analysis showed that compounds at a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration, which caused a higher mortality on juveniles of *Meloidogyne incognita* strain 3, were β -sitosterol + stigmasterol (74,4% mortality relative to control), the no-identified alcohol (69,7 %), $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (68,3 %) and the L-dopa (64,4 %).

1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda por alimentos no mundo, os fatores que acarretam reduções em produtividades agrícolas, especialmente os fitopatógenos, devem receber prioridade nas investigações científicas. Nas regiões tropicais, por exemplo, a presença de fitonematóides, muitas vezes em solos de alta fertilidade, tem trazido elevados prejuízos aos agricultores, em virtude da redução que induzem às colheitas e, em algumas regiões, devido à desvalorização da propriedade rural para fins de operação de crédito bancário. Em tais situações, a produção de alimentos e de outros produtos agrícolas é sempre severamente afetada (MOURA, 1996).

1.1. Nematóides

Os nematóides são organismos tipicamente fusiformes, isto é, alongados e afilando para as extremidades, sendo o comprimento das espécies do solo de 0,5 a 4 mm. Representam o mais numeroso grupo de animais multicelulares da terra. Do ponto de vista ecológico, os nematóides podem ser classificados em três grupos: parasitos de animais, de vida livre (no solo, em águas doces e salgadas, etc.) e parasitos de plantas (TSAI et al., 1991).

Acredita-se que haja cerca de 500.000 espécies de nematóides ocorrendo em todos os ambientes onde há possibilidade de vida, sendo em maior número nos solos e oceanos. Em seu conjunto, os nematóides constituem um dos maiores inimigos da humanidade, não sendo exagerado afirmar que a sobrevivência do homem no planeta depende da manutenção de uma luta permanente e organizada contra os mesmos (LORDELLO, 1984).

Os nematóides fitoparasitos causam enorme prejuízo à agricultura, pois, além de reduzirem as colheitas, afetam sobremaneira a qualidade do produto colhido, limitam o uso do solo com sua presença e levam a gastos adicionais com fertilizantes e defensivos. Vários trabalhos apresentam estimativas da importância econômica dos nematóides parasitos de plantas na produção das culturas, no mundo ou por países, mas os valores precisos ainda não estão determinados (TIHOHOD, 1993).

As perdas devidas aos fitonematóides, em 21 culturas de importância mundial, foram estimadas em 77 bilhões de dólares anuais, baseadas na produção e nos preços de 1984. Quando todas as culturas são consideradas, a estimativa excede a 100 bilhões de dólares (Sasser e Frickman, 1987, citados por TIHOHOD, 1993).

Dos vários gêneros de nematóides, pode-se dizer que os causadores de galhas, do gênero *Meloidogyne*, constituem um dos flagelos da humanidade, pois contam-se às centenas as plantas hospedeiras dos nematóides deste gênero (LORDELLO, 1984).

O gênero *Meloidogyne* Goeldi pertence à família Heteroderidae, englobando também os gêneros *Heterodera* e *Globodera*. Este gênero foi criado em 1887, no Brasil, com a descrição, por Emílio Goeldi, da espécie-tipo *Meloidogyne exigua*, parasito do cafeeiro, encontrada em muitas lavouras decadentes da então chamada província do Rio de Janeiro (BERGAMIN FILHO et al., 1995). Esses nematóides são, em geral, endoparasitos obrigatórios. Na reprodução, os ovos são depositados pelas fêmeas no interior de uma substância gelatinosa que flui previamente pelo ânus, formando massas de ovos. Na maioria das combinações hospedeiro-parasita, a planta reage formando galha, resultante

de hiperplasia e hipertrofia que ocorrem nas células do tecido radicular (Figura 1) (LORDELLO, 1984).

Até o momento, pelo menos 80 espécies de *Meloidogyne* já foram descritas, das quais quatro são consideradas as mais importantes, pela distribuição geográfica e pelo alto grau de polifagismo que apresentam, a saber: *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood. Além destas, já foram assinaladas no Brasil *M. coffeicola* Lordello & Zamith, *M. graminicola* Golden & Birchfield e *M. thamesi* Chitwood, entre outras (BERGAMIN FILHO et al., 1995; MOURA, 1996).

Segundo Sasser (1977 e 1980), citado por MOURA (1996), um dos maiores obstáculos à produção de alimentos no mundo é o parasitismo dos nematóides das galhas. Por possuir ampla distribuição geográfica, com ocorrência em quase todos os países do mundo, pela extensa gama de plantas hospedeiras, pelo envolvimento com fungos, bactérias e vírus ou mesmo com outros nematóides, nas interações e nas doenças do tipo complexo, e considerando as grandes dificuldades inerentes às práticas de controle, o gênero *Meloidogyne* pode ser considerado um dos mais importantes fitopatógenos.

A ação desses fitonematóides sobre muitas plantas cultivadas induz significativas reduções na produtividade agrícola e, em outros casos, a redução do valor comercial do produto, pelo aspecto desagradável que confere às partes parasitadas, a exemplo dos tubérculos de batata (Figura 2), das túberas de inhame, das vagens de amendoim, das raízes de cenoura e tomate, entre outros. Plantas afetadas por *Meloidogyne* spp. tornam-se mais suscetíveis a outros fitopatógenos, ficam menos resistentes a estresses, especialmente hídricos, e não respondem satisfatoriamente às práticas de adubação.

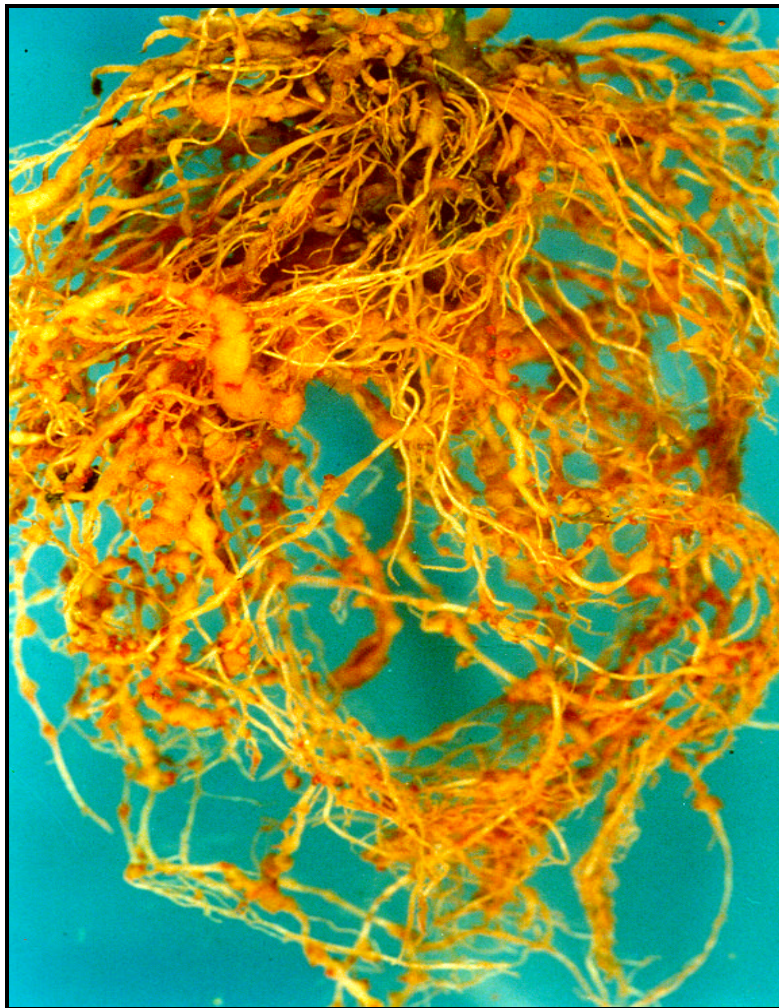


Figura 1 - Raízes de tomateiro infectadas por *Meloidogyne*, apresentando galhas e massas de ovos.



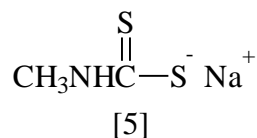
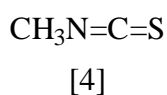
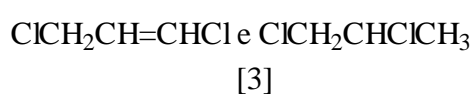
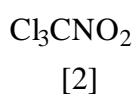
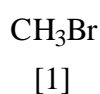
Figura 2 - Tubérculos de batata fortemente desfigurados por nematóides do gênero *Meloidogyne*.

Em face do grande problema que é a presença de nematóides nos solos e, por conseguinte, nas culturas, faz-se necessária a busca de métodos de controle dos mesmos. A literatura cita vários métodos, como: processos mecânicos de limpeza, métodos culturais (alqueive, inundação do solo, destruição das plantas atacadas, época de plantio e colheita, rotação de culturas), controle biológico, adubação e tratos da cultura, utilização de variedades resistentes e, ainda, controle químico. Este último consiste na aplicação de nematicidas no solo, no ato do plantio ou com antecedência de 20 dias (LORDELLO, 1984).

1.2. Nematicidas

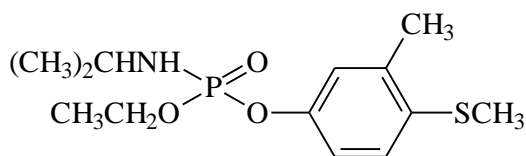
Os nematicidas, como o nome sugere, são substâncias que apresentam atividade deletéria sobre os nematóides.

Os produtos nematicidas podem ser divididos em dois grupos: os fumigantes e os não-fumigantes e sistêmicos. Os fumigantes se subdividem em duas classes, os compostos halogenados e os liberadores de metilisotiocianato. Como exemplos de nematicidas halogenados têm-se brometo de metila [1], cloropicrina (tricloronitrometano) [2] e D.D. (1,3-dicloropropeno e 1,2-dicloropropano) [3]. Na classe dos liberadores de metilisotiocianato encontram-se metilisotiocianato [4] e vapam (metil ditiocarbamato de sódio) [5].

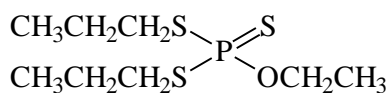


Os nematicidas não-fumigantes e sistêmicos são subdivididos nas classes dos organofosforados e dos organocarbamatos. Esses compostos atuam inibindo a atividade da enzima colinesterase dos nematóides, causando então a morte dos mesmos.

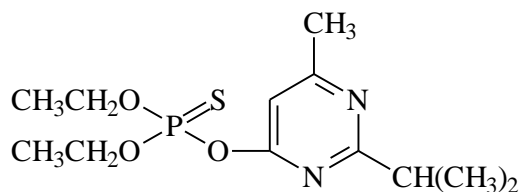
Como exemplos de nematicidas organofosforados podem-se destacar o fenamifos [3-metil-4-(metiltio)fenil(1-metiletil)fosforamidato de etila] [6], mocap (O-etil-S,S-dipropilditiofosfato) [7], diazinon {O,O-dietil O-[6-metil-2-(1-metil-etil)-4-pirimidinil] fosforotioato} [8] e paration ou folidol [O,O-dietil-O-(4-nitrofenil)fosforotioato] [9]. Da classe dos organocarbamatos têm-se aldicarb [2-metil-2-(metiltio)propanal-O-(metilcarbamoil)oxima] [10], oxamil {metil N',N'-dimetil-N-[(metilcarbamoil)oxi]-1-tiooxamimidato} [11] e carbofuran ou furadan (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranilmetilcarbamato) [12] (BARBERÁ, 1974; LORDELLO, 1984).



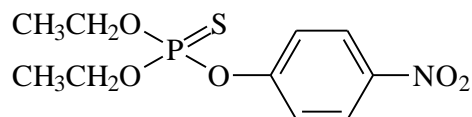
[6]



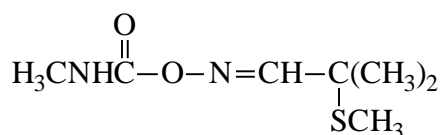
[7]



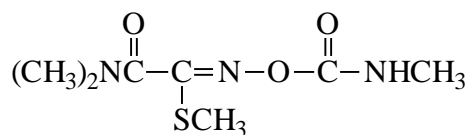
[8]



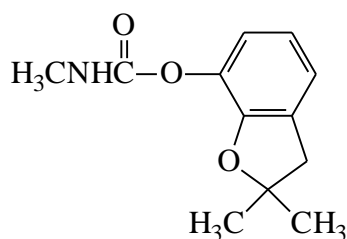
[9]



[10]



[11]



[12]

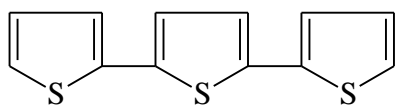
Em geral, os nematicidas destroem até 90% da população de fitonematóides de uma gleba, porém a população residual consegue se reproduzir rapidamente após cessar a atividade do composto. Além desse inconveniente, eles apresentam outros fatores desfavoráveis, como o fator econômico, já que o controle químico é dispendioso, podendo ser uma adoção antieconômica para culturas de menor valor. Outro inconveniente é a possibilidade de os nematicidas deixarem resíduos tóxicos, levando à contaminação do solo, das águas subterrâneas e dos produtos agrícolas (LORDELLO, 1984).

Devido a esses inconvenientes faz-se necessária a busca de métodos mais econômicos e menos prejudiciais ao meio ambiente e ao homem. Dentre estes métodos estão a utilização do sistema de rotação de culturas, com o uso de

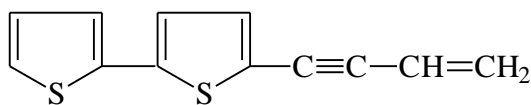
plantas resistentes ou antagônicas, e o emprego de plantas que apresentam alguma atividade nematicida.

TENENTE (1980) afirma que o controle do nematóide *Meloidogyne incognita* pode ser feito através de métodos biológicos, como por exemplo a utilização de plantas resistentes ou antagônicas, que podem apresentar exsudatos radiculares com propriedades nematicidas ou nematostáticas ou, ainda, atuar após a sua penetração nas raízes, não permitindo que o ciclo do nematóide se complete, ou mesmo reduzindo a sua reprodução.

O cravo-de-defunto (*Tagetes* spp., Asteraceae) está entre as primeiras plantas a ter seus compostos nematicidas examinados, pois frequentemente suprimia as populações de nematóides do solo (CHITWOOD, 1993). Dois compostos foram identificados como tendo atividade nematicida: α -tertienila [13] e 5-(but-3-en-1-in-1-il)-2,2`- bitienila [14].

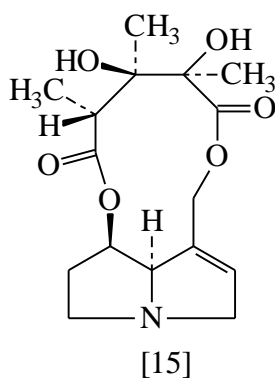


[13]

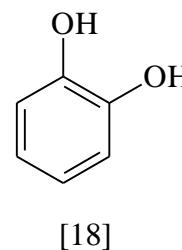
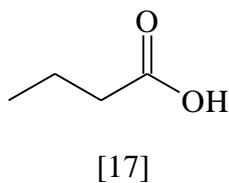
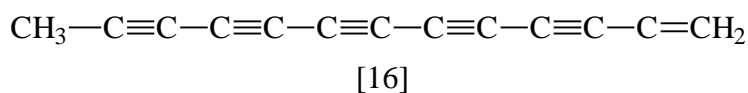


[14]

Outra planta utilizada para suprimir nematóides é a *Crotalaria* spp. (Fabaceae), tendo o alcalóide monocrotalina [15], isolado de *Crotalaria spectabilis*, inibido o movimento de juvenis de *M. incognita* (Fassuliotis et al., 1969, citados por CHITWOOD, 1993).



CHITWOOD (1993) cita ainda outras plantas que apresentaram alguma atividade biológica diante dos fitonematóides, dentre as quais estão *Helenium* sp., *Secale cereale* (cevada) e *Eragrostis curvula*. Destas espécies, foram isolados, respectivamente, tridec-1-en-3,5,7,9,11-pentino [16], ácido butírico [17] e pirocatecol [18], que são os compostos responsáveis pela atividade das mesmas.



Muitas outras plantas têm sido utilizadas nessa luta contra os fitonematóides. Dentre elas, podem-se destacar as pertencentes ao gênero *Mucuna*, cuja utilização como planta antagonista, para redução da população de fitonematóides, já é prática constante (FUJII et al., 1992).

1.3. *Mucuna* sp.

1.3.1. Características e utilização de *Mucuna* sp.

A *Mucuna* sp. é um gênero pertencente à família Leguminosae, que consiste de 100-200 espécies, sendo tipicamente de clima tropical e subtropical. As plantas deste gênero, o qual é originário da China, Malásia ou Índia, apresentam crescimento vigoroso e rasteiro, com ramos trepadores e frutos do tipo vagem, grossos e grandes, com pêlos. Suas sementes são em forma de feijão, sendo bastante resistentes (VIEIRA, 1960).

O gênero *Mucuna* Adans é usado para descrever várias espécies de legumes de crescimento perene e anual. O gênero *Stizolobium* (subgênero) foi usado por Bort (1909), citado por BUCKLES (1995), para distinguir a *Mucuna* de crescimento anual das demais espécies de *Mucuna*, mas esta distinção não foi mantida (BUCKLES, 1995).

A *Mucuna* é autopolinizadora, e as espécies mais comumente citadas são *M. deeringiana*, *M. utilis*, *M. pruriens*, *M. cochichinensis*, *M. nivea*, *M. capitata*, *M. hassjoo*, *M. diabolica* e *M. aterrima*. Entretanto, a taxonomia destas espécies é confusa e várias destas designações podem ser sinônimas (Duke, 1981, citado por BUCKLES, 1995).

As principais diferenças entre as espécies cultivadas são as características da pubescência da vagem, a cor da semente e o número de dias para a colheita da vagem (BUCKLES, 1995). A mucuna-preta (*Mucuna aterrima*, sinonímia em desuso: *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy) tem sido a espécie mais cultivada e estudada deste gênero no Brasil, tendo se mostrado eficiente no controle de várias espécies de *Meloidogyne* (VALLE, 1996). Sob condições favoráveis, pode chegar a medir de 10-14 m de extensão e produzir até 35 t/ha de massa verde (Figura 3), 6 a 8 t/ha de massa seca, incluindo mais de 1 t/ha de raízes secas, e 1,0 a 1,5 t/ha de sementes. Fixa aproximadamente 120 a 157 kg de N/ha/ano, proporcionando aumentos na produtividade de várias culturas (WUTKE, 1993).

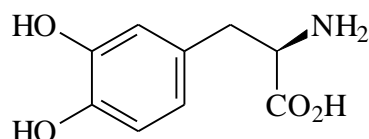
Os cultivares do gênero *Mucuna* são utilizados largamente para a adubação verde e, ou, rotação de culturas. Suas folhas são utilizadas para forragem; suas fibras, para alimentação, principalmente como complemento de rações; e suas sementes e seus caules têm uso medicinal na África e na China (FUJII et al., 1992).

Estudos visando selecionar as melhores leguminosas para a produção de adubo verde têm sido realizados desde 1934, tendo se destacado a *Mucuna aterrima*, *Crotalaria paulina* e *Canavalia ensiformes* (Neme, 1934, citado por NOGUEIRA, 1994).



Figura 3 - Vista de uma plantação de mucuna-preta (grande produção de massa verde).

JANZEN et al. (1973) afirmaram que as plantas do gênero *Mucuna* possuem ação alelopática contra insetos e que esta ação é devida à L-Dopa (L-3,4-diidroxifenilalanina) [19]. FUJII et al. (1991) também observaram que a mucuna é capaz de inibir o crescimento de várias plantas daninhas, tendo o envolvimento também de L-Dopa.



[19]

Na China, a *Mucuna birbwoodiana* é utilizada para fins medicinais, como promotora da circulação do sangue, para o tratamento de dores ou dormência nas articulações e, ainda, para menstruação irregular (GODA et al., 1987; DING et al., 1991).

A utilização de mucuna em sistema de rotação de culturas, para reduzir os níveis populacionais de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* sp.), é prática que ocorre desde os anos 20 na região sudeste dos Estados Unidos. Mais recentemente, o uso da mucuna tem sido efetivo no controle da população de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, em várias culturas (McSORLEY et al., 1994).

WEAVER (1994) utilizou *Mucuna deeringiana* e o nematicida aldicarb para controlar *Meloidogyne arenaria* em amendoim. Os resultados indicaram que a maior produção de amendoim foi obtida com o uso da mucuna no sistema de rotação de culturas. RODRÍGUEZ-KÁBANA e CANULLO (1992a) necessitaram de apenas dois meses de cultivo da mesma espécie de mucuna, *Mucuna deeringiana*, antecendo a cultura de amendoim, para obter um bom controle de *Meloidogyne arenaria*.

FERRAZ et al. (1977) recomendaram a utilização de um sistema de rotação de culturas com mucuna para controle conjunto da fusariose [*Fusarium*

oxysporum f. *vasinfectum* (Atk.)] e de nematóides de galhas [*Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949] em algodoeiro.

TENENTE (1980) classificou a mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) como planta hospedeira desfavorável a *Meloidogyne incognita* raça 3, após verificar que a planta pode ser parasitada, porém só um pequeno número de juvenis consegue chegar à fase adulta. O autor afirmou ainda que a mucuna-preta não produziu exsudato radicular que causasse algum efeito em *M. incognita*. A mucuna-preta foi também considerada hospedeira desfavorável a *M. incognita* raça 4 (TENENTE e LORDELLO, 1987) e a *M. incognita* raça 2 (JAEHN, 1993). SANTOS e RUANO (1987) afirmaram que *Mucuna* spp., *Crotalaria* spp., *Tagetes* spp. e algumas variedades de *Avena sativa* foram materiais promissores no controle de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *Meloidogyne javanica*.

RESENDE (1986) estudou o efeito de mucuna-preta (*Mucuna aterrima* Piper & Tracy), cinza (*M. cinerea* Piper & Tracy), rajada e anã (*M. deeringiana* Bort.) e jaspeada e branca [*M. nivea* (Roxb.) DC.] sobre os nematóides *Meloidogyne incognita* raça 3 e *Meloidogyne javanica*, em rotação com o quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L.). Todas as seis variedades comportaram-se como hospedeiras desfavoráveis a *Meloidogyne incognita* e suscetíveis a *Meloidogyne javanica*, mas menos suscetível que o quiabeiro sozinho. O autor ressaltou que o estudo foi baseado apenas em relação ao efeito do sistema radicular sobre os nematóides, devendo novos estudos serem feitos, utilizando-se a parte aérea das mucunas.

VICENTE e ACOSTA (1987), após analisarem os resultados obtidos pelo efeito do exsudato da raiz de *Mucuna deeringiana*, em rotação com tomate, nas populações de *Meloidogyne incognita*, sugeriram a presença de compostos capazes de inibir a presença de nematóides na raiz desta leguminosa.

Trabalhos mais recentes têm sido feitos utilizando-se *Mucuna* sp. para redução do nematóide de cisto da soja *Heterodera glycines* Ichinohe, considerado o parasito mais destrutivo dentre os que atacam a soja (Noel, 1992, citado por VALLE, 1996). Resultados obtidos em casa de vegetação mostram

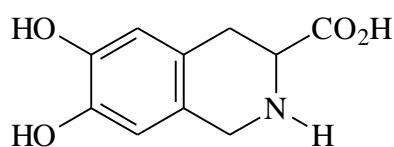
que a mucuna-preta é eficiente em reduzir a população deste nematóide no solo (DIAS et al., 1995; VALLE, 1996).

RODRÍGUEZ-KÁBANA et al. (1992b) observaram um bom controle de *H. glycines* no solo com a *Mucuna deeringiana*. Esta mesma espécie foi utilizada, em rotação com a soja, para o controle de *Meloidogyne arenaria* e *H. glycines* e reduziu o número de juvenis dos dois nematóides no solo, possibilitando aumento na produção de soja (WEAVER et al., 1993).

1.3.2. Composição química de *Mucuna* sp.

No que tange à composição química, poucos estudos foram realizados no gênero *Mucuna*. As sementes de *M. pruriens* (L.) DC., variedade utilis, são utilizadas na alimentação humana, por apresentarem alto teor de proteína. Na Índia, em um estudo sobre legumes, a *M. prurita* e a *M. capitata* apresentaram teores de proteína de 32 e 36 %, respectivamente (NIRANJAN e KATIYAR, 1979).

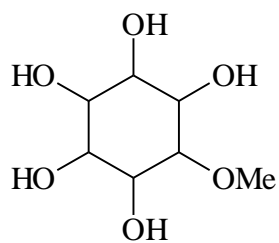
As sementes das plantas do gênero *Mucuna* apresentam alta concentração (6-9 %) de um aminoácido não-essencial denominado L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina) [19], o qual foi primeiramente isolado da *Vicia faba* em 1913 (BELL et al., 1971). Estes mesmos autores isolaram e identificaram a substância L-3-carboxi-6,7-diidroxí-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (um iminoácido) [20] da semente da *M. mutisiana*.



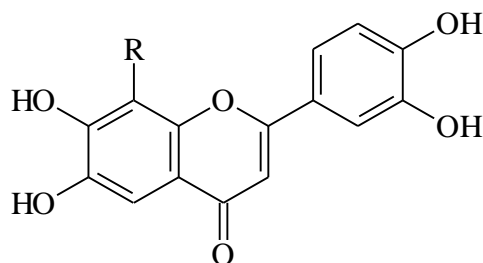
[20]

Das folhas de *Mucuna sempervirens* Hensl. foram isolados o D-pinitol [21] (PLOUVIER, 1962) e três C-glicosilflavonas: 8-C- α -L-arabinosiluteolina

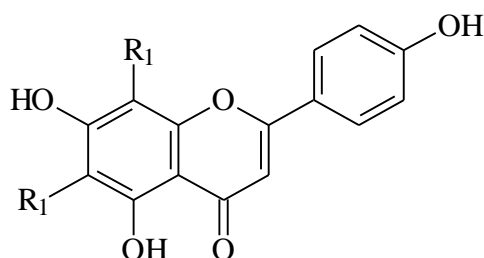
[22], 6,8-di-C- α -arabinosilapigenina [23] e isoorientina [24] (ISHIKURA e YOSHITAMA, 1988).



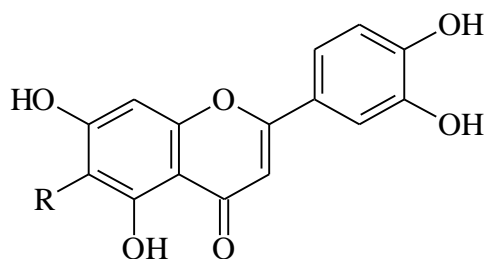
[21]



[22]: R = C- α -L-arabinosil

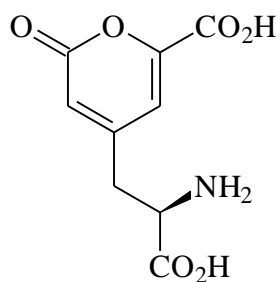


[23]: R₁ = C- α -L-arabinosil

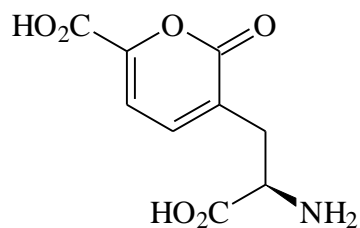


[24]: R = C-glicosil

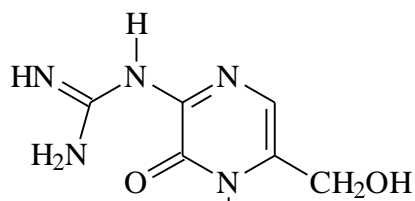
De *Stizolobium hassjoo* (subgênero da *Mucuna* sp.) foram isolados dois aminoácidos não-protéicos, denominados ácidos estizolóbico [25] e estizolobínico [26] (HATTORI e KOMAMINE, 1959; SHINOZAKI e ISHIDA, 1988). Das sementes de *S. hassjoo* isolou-se uma amina, denominada estizolamina (1-metil-3-guanidino-6-hidroxi-metilpirazin-2-ona) [27] (YOSHIDA, 1976). Do pericarpo de *S. hassjoo* foram isoladas e identificadas três pterinas não-conjugadas: D-eritro-neopterina [28], 6-hidroxi-metilpterina [29] e isoxantopterina [30] (YOSHIDA e AKINO, 1980).



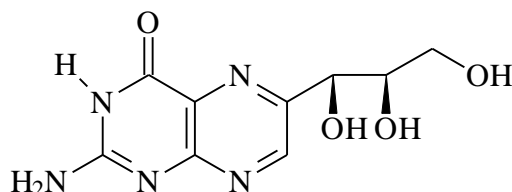
[25]



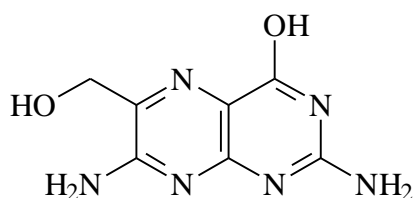
[26]



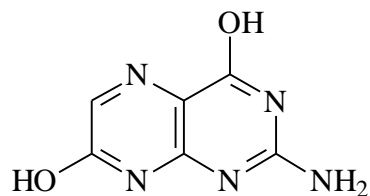
[27]



[28]



[29]



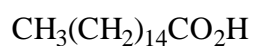
[30]

HASAN et al. (1980) relataram a presença de epoxiácidos em uma análise feita no óleo das sementes de *M. pruriens*. Estes foram identificados como os ácidos (9Z)-*cis*-12,13-epoxioctadec-9-enóico (ác. vernólico) [31] e o (9E)-*cis*-12,13-epoxioctadec-9-enóico [32]. Esses mesmos autores também relataram o teor de ácidos graxos no óleo da semente: ácido palmítico [33] (21 %), ácido esteárico [34] (2,7 %), ácido oléico [35] (16,8 %), ácido linoléico [36] (46,1 %), ácido linolênico [37] (8,4 %) e os epoxiácidos [31] e [32] com 4,0 % e 1,0 %, respectivamente.

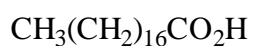


[31]: Z

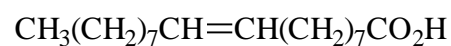
[32]: E



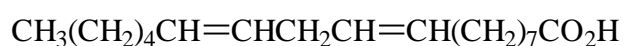
[33]



[34]



[35]

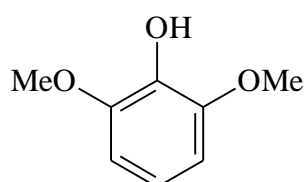


[36]

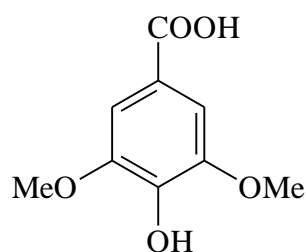


[37]

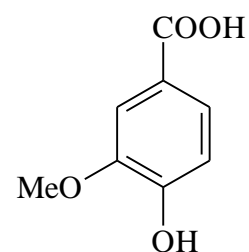
GODA et al. (1987) isolaram, do caule da *Mucuna birdwoodiana*, quatro compostos fenólicos: 2,6-dimetoxifenol [38], ácido sirínico [39], ácido vanílico [40] e N-(*trans*-feruloil)tiramina [41]. Os compostos [38] e [41] apresentaram efeito inibitório na biossíntese de prostaglandina.



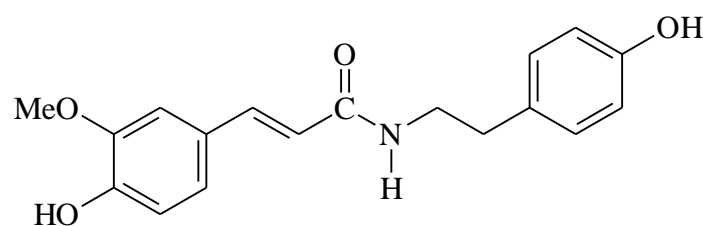
[38]



[39]

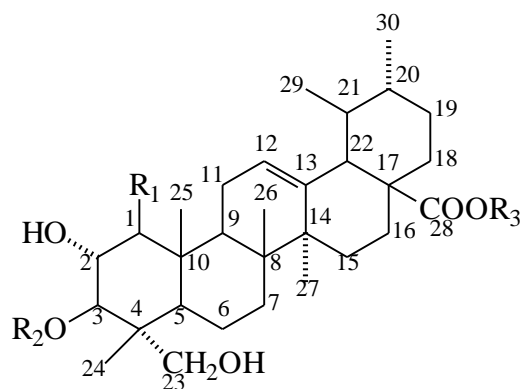


[40]



[41]

DING et al. (1991) obtiveram, também do caule da *Mucuna birdwoodiana*, quatro triterpenos do tipo sapogenol ([42], [43],[44] e [45]) e quatro triterpenos glicosilados ([46], [47], [48] e [49]). Os triterpenos isolados são os seguintes: 2 α ,3 β ,23-triidroxiurs-12-en-28-oato de metila (asiatato de metila) [42], 2 α ,3 β , diidroxiolean-12-en-28-oato de metila (maslinato de metila) [43], 1 β ,2 α ,3 β ,23-tetraidroxiolean-12-en-28-oato de metila (mucunagenina A) [44], 1 β ,2 α ,3 β ,23-tetraidroxiolean-12-en-28-oato de metila (mucunagenina B) [45], 3-O-(6-O-metil- β -D-glicoronopiranosil) asiatato de metila [46], 3-O-[α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2)]-6-O-metil- β -D-glicoronopiranosil maslinato de metila [47], 3-O-[α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2)]-6-O-metil- β -D-glicoronopiranosil asiatato de metila [48] e ácido 3-O-(6-O-metil- β -D-glicoronopiranosil) 28-O- β -D-glicopiranosídeo asiático [49].



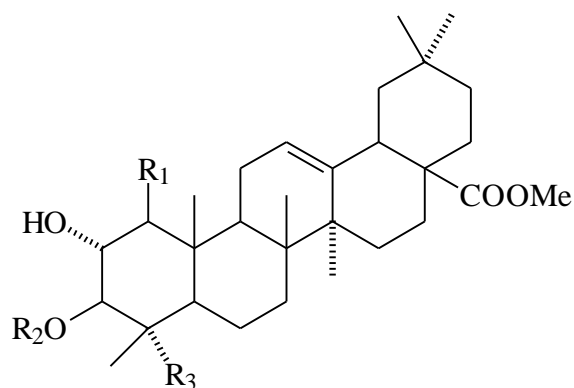
[42]: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Me

[45]: R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = Me

[46]: R₁ = H, R₂ = β -D-Glc UA-Me, R₃ = Me

[48]: R₁ = H, R₂ = α -L-Ara Pir(1 \rightarrow 2)- β -D-Glc UA-Me, R₃ = Me

[49]: R₁ = H, R₂ = β -D-Glc UA-Me, R₃ = β -D-Glc

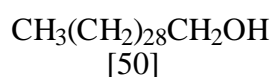


[43]: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Me

[44]: R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = CH₂OH

[47]: R₁ = H, R₂ = α-L-Ara Pir(1→2)-β-D-Glc UA-Me, R₃ = Me

NOGUEIRA (1994) isolou, da parte aérea da mucuna-preta (*Mucuna aterrima*), o álcool triacontan-1-ol [50] e o tetracosanoato de triacontila [51], um éster de cadeia longa, os quais, através de testes biológicos, apresentaram atividade nematicida. Deve-se ressaltar que as estruturas desses compostos, [50] e [51], foram propostas apenas com base nos espectros no infravermelho e RMN de hidrogênio. Também foi isolada, da mesma parte da planta, uma mistura de β-sitosterol e estigmasterol.



Apesar de essas várias substâncias terem sido isoladas das espécies de *Mucuna*, apenas a L-Dopa tem uma função reconhecida pelos pesquisadores até o momento, pois confere ação alelopática à mucuna contra insetos e plantas daninhas. Além disso, essa substância vem sendo testada, a partir de estudos iniciais da década de 70, quanto à sua utilização em pacientes portadores do mal de Parkinson (BELL e JANZEN, 1971). Os compostos que conferem atividade nematicida às plantas do gênero *Mucuna* ainda não foram caracterizados, apesar

da reconhecida atividade e de sua vasta utilização como planta antagonista a nematóides.

FUJII et al. (1992) afirmaram que as plantas do gênero *Mucuna* possuem habilidades especiais de eliminação de plantas daninhas, tolerância a pestes e supressão da população de nematóides, além de melhorarem as condições físicas e químicas do solo. Assim, elas poderiam ser amplamente utilizadas, levando à redução das aplicações de agroquímicos sintéticos.

Em face disso, este trabalho teve como objetivo comprovar a eficiência de mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) no controle do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3. Para avaliar essa atividade foram realizados ensaios biológicos *in vitro* com os extratos brutos etanólicos da raiz e da parte aérea da mucuna-preta (obtidos a quente e a frio). Também foi realizado o estudo químico do caule e da raiz desta planta, buscando a identificação dos princípios ativos responsáveis pela atividade nematicida e, ou, nematostática, de modo a esclarecer o mecanismo de ação da mesma diante dos fitonematóides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

- NOTAS VÁLIDAS PARA ESTE CAPÍTULO:

1- Para todas as separações cromatográficas em coluna, utilizou-se sílica-gel 60 (70 - 230 Mesh-ASTM, Merck).

2- Para todas as análises cromatográficas em camada delgada, utilizaram-se placas da Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,25 mm de sílica-gel com indicador de fluorescência UV₂₅₄).

3- Como reveladores, foram utilizadas radiação ultravioleta e soluções de ácido fosfomolibdico e *p*-anisaldeído, preparadas de acordo com CASEY et al. (1990).

4- Todas as frações foram concentradas sob pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório.

5- Os pontos de fusão foram determinados em bloco de Kofler R. Winkel Sottingen, modelo 17717, com as devidas correções.

6- Os cromatogramas em fase gasosa foram obtidos em dois cromatógrafos:

- Shimadzu GC 14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), acoplado a um registrador e integrador Chromatopac C-R6A da Shimadzu, sendo utilizadas duas colunas, de acordo com a análise proposta:

- . Coluna Carbowax 20 M (30 m x 0,25 mm), fluxo do gás de arraste (H_2): 0,9 mL/min. Temperaturas: injetor (200 °C), detector (220 °C) e coluna (inicial 150 °C, aumentando 5 °C/min até atingir 200 °C, permanecendo por 40 minutos nesta temperatura), para as frações CP(2)1-19, CP(2)20-40, CP(3)111-179 e CP(3)180-265 (para as análises dos ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos).

- . Coluna empacotada SP 2330 (2,1 m x 2 mm), fluxo do gás de arraste (N_2): 20 mL/min. Temperaturas: injetor (250 °C), detector (250 °C) e coluna (200 °C, isotérmica durante dez minutos e, então, programada na razão de 1 °C/min, até atingir a temperatura máxima de 220 °C, permanecendo isotérmica durante dez minutos), utilizada para a fração RPB(1)160-191 (análise de açúcares na forma de seus alditóis-acetatos).

- Shimadzu GC 17-A, acoplado a microcomputador CR 7-A, com injetor automático (AOC 17), coluna LM 100 (30 m x 0,32 mm), fluxo do gás de arraste (N_2): 1,1 mL/min. Temperaturas: injetor (240 °C), detector (280 °C) e coluna (225 °C, isotérmica), para a fração RPB(2)21-50 (análise de ácidos graxos).

7- Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Mattson Instruments FTIR 3000, na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} , no Departamento de Química - ICEX - UFMG, Belo Horizonte. Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr a 1 %. Quando oleosas, foram analisadas em filmes líquidos e em placas de NaCl.

8- Os espectros de ressonância magnética nuclear a 400 MHz foram obtidos em um espectrômetro Bruker WH 400 no Departamento de Química - ICEX - UFMG, Belo Horizonte.

9- A análise de sódio e potássio dos constituintes inorgânicos por emissão atômica foi feita em um espectrofotômetro de absorção atômica Carl Zeiss Jena, modelo AAS3, no Laboratório de Química Analítica - DEQ - UFV.

10- O espectro de massas foi registrado em um espectrômetro V. G. ANALYTICAL ZAB-IF, no Departamento de Química da Universidade de Gales, País de Gales.

2.1. Ensaio biológico preliminar - ensaio das placas de incubação

2.1.1. Preparo dos extratos a quente e a frio de mucuna-preta

Inicialmente fez-se a coleta da mucuna-preta (raiz, caule e folhas), sendo esta realizada na horta nova da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situada no Fundão, na época de seu florescimento. O material coletado foi separado, seco ao ar, moído e estocado para preparo dos respectivos extratos.

Os extratos a frio da raiz e da parte aérea (caule e folhas) da mucuna-preta foram obtidos através da extração de 10 g de cada material com 130 mL de etanol, por um período de sete dias. A remoção do solvente, por destilação em evaporador rotatório sob pressão reduzida, levou à obtenção de 0,30 g de extrato da raiz e 0,70 g de extrato a frio da parte aérea.

Os extratos a quente foram obtidos através da extração do material (raiz e parte aérea) com etanol, em aparelho soxhlet, por 60 horas. A remoção do solvente, por destilação em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, levou à obtenção de 0,99 g de extrato da raiz e 1,48 g de extrato a frio da parte aérea.

2.1.2. Preparo das emulsões para os ensaios biológicos

Para realização dos ensaios biológicos, foram preparadas emulsões dos extratos a serem testados, de acordo com o seguinte procedimento:

A 1,0 g de cada extrato (raiz a quente e a frio e parte aérea a quente e a frio) foram adicionados 10 mL de água destilada e duas gotas do detergente não-iônico Tween 20. As amostras foram sonicadas em aparelho de ultra-som, por uma hora. Após este período estas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, sendo o volume completado com água destilada.

Essas soluções, a 1 % m/v, foram levadas aos ensaios biológicos.

2.1.3. Obtenção das massas de ovos do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3

As massas de ovos utilizadas nos ensaios biológicos foram obtidas através da multiplicação de culturas puras do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3 em tomateiros cv. Santa Cruz, armazenados em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV. Estas massas de ovos foram retiradas das raízes das plantas, após a remoção das plantas dos vasos, com o auxílio de um estilete e um microscópio estereoscópico (lupa), sendo as massas então levadas para as placas, onde se realizaram os ensaios.

2.1.4. Montagem do ensaio biológico preliminar

Para montagem do ensaio biológico, executou-se o seguinte procedimento:

Tomaram-se alíquotas de 3 mL de cada um dos extratos (raiz a frio e a quente e parte aérea a frio e a quente), em uma concentração de 1 % m/v, sendo estas colocadas em placa de Petri (de 5 cm de diâmetro). Esse procedimento foi repetido para uma amostra-referência, denominada branco (água destilada e duas gotas de Tween 20).

Em seguida, adicionaram-se água destilada a cada uma das placas e 0,3 mL do detergente Tween 20, sendo as amostras homogeneizadas em aparelho de ultra-som, por 30 minutos.

Em cada placa foram adicionadas cinco massas de ovos do nematóide *Meloidogyne incognita* raça 3. Estas massas foram colocadas sobre telas de náilon de 1 mm de espessura e forradas com lenço de papel facial, para que os juvenis de 2^o estágio eclodidos atravessassem e ficassem na suspensão. Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C, no escuro.

Foram feitas contagens após 48, 96 e 144 horas, em um microscópio estereoscópico, para se determinar o número de juvenis eclodidos em cada solução, com o auxílio da câmara de contagem de Peters.

Após cada contagem, os extratos eram recolocados nas placas de Petri, sem os juvenis eclodidos, e incubados novamente, até a próxima contagem.

Todo o procedimento foi feito utilizando-se quatro repetições para cada extrato. A Figura 4 ilustra a montagem do experimento.

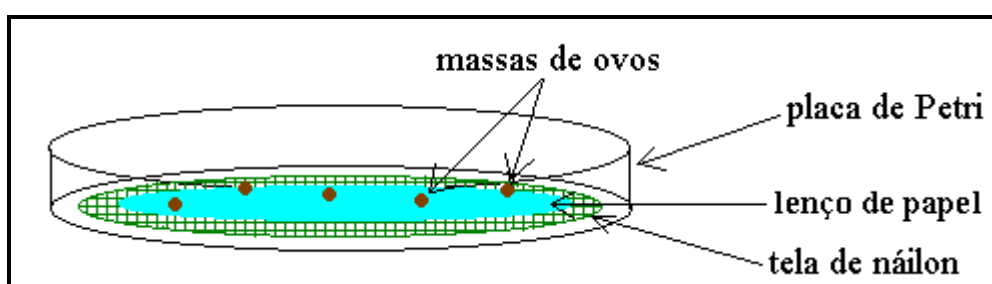


Figura 4 - Esquema da montagem utilizada para o ensaio das placas de incubação.

2.2. Isolamento dos constituintes da mucuna-preta (*Mucuna aterrima*)

A) Coleta do material

Fez-se a coleta de raiz, caule e folhas da mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) na horta nova da Universidade Federal de Viçosa, situada no Fundão, na época de seu florescimento. O material coletado foi separado, seco ao ar, moído e estocado, para preparo dos respectivos extratos.

B) Obtenção do extrato etanólico do caule da mucuna-preta

O caule da mucuna-preta (1820 g), previamente moído, foi submetido à extração com etanol em aparelho soxhlet, por duas semanas. A remoção do

solvente, por destilação em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, levou à obtenção de 85,0 g de extrato etanólico.

C) Obtenção dos extratos benzênico e etanólico da raiz da mucuna-preta

A raiz da mucuna-preta (615 g), previamente moída, foi submetida a extrações sucessivas com benzeno e etanol, em aparelho soxhlet. Após a remoção dos solventes, por destilação em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, foram obtidos 6,70 g de extrato benzênico e 29,55 g de extrato etanólico.

D) Elaboração do extrato etanólico do caule

Inicialmente, no extrato etanólico do caule da mucuna-preta, ocorreu a precipitação de um sólido branco, após o extrato ter sido deixado em repouso na geladeira. O material foi filtrado, sendo o precipitado lavado sucessivas vezes com metanol e solubilizado em metanol a quente, com gotas de água. À solução obtida, ainda amarelada, adicionou-se carvão ativo e levou-se ao aquecimento. Em seguida procedeu-se a nova filtração a vácuo, sendo o filtrado levado à ebulição, em banho-maria, para recristalização. O material sólido obtido foi codificado como CPS₁.

Após a separação dos sólidos, o extrato etanólico do caule da mucuna-preta foi submetido a uma análise preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD), a fim de se investigar a sua complexidade e selecionar o sistema de solventes a ser utilizado para o seu fracionamento.

Escolhido o sistema de solventes, o extrato foi submetido ao fracionamento em uma coluna filtrante (funil de vidro sinterizado com 13,5 cm de diâmetro e 10,5 cm de altura, sendo o kitazato de 2 L) (Figura 5). As frações obtidas foram inicialmente agrupadas de acordo com o solvente utilizado, sendo estas em número de dez: solvente hexano (2,5 L) (fração 1), hexano-acetato de etila (2:1) (2,5 L) (fração 2), acetato de etila (1,5 e 1 L) (frações 3 e 4), acetato de

etila-metanol (9:1) (1,5 e 1 L) (frações 5 e 6), acetato de etila-metanol (1:1) (1, 1,8 e 1 L) (frações 7, 8 e 9) e, finalmente, metanol (3 L) (fração 10).

Essas frações foram analisadas por CCD, sendo então reunidas em cinco grupos, de acordo com o comportamento cromatográfico dos mesmos. Estes foram submetidos a posterior fracionamento, em coluna de sílica-gel, de acordo com a análise de seus espectros no IV e da sua complexidade por CCD, bem como de seu estado físico, como avaliação preliminar de possível sucesso no fracionamento. O fluxograma mostrado na Figura 6 mostra os fracionamentos realizados.

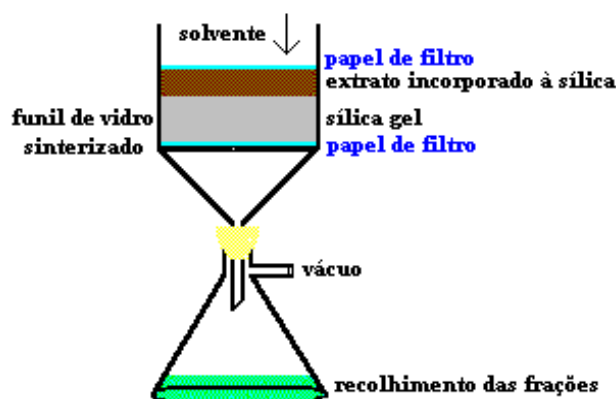


Figura 5 - Esquema da coluna filtrante para o fracionamento do extrato etanólico do caule da mucuna-preta.

E) Elaboração do extrato etanólico da raiz

O extrato etanólico da raiz da mucuna-preta, após ser concentrado sob pressão reduzida, foi deixado em repouso. Ocorreu a decantação de um material, sendo este separado do material sobrenadante. Desse modo, originou-se RPE(1) (material sobrenadante) (7,81 g) e RPE(2) (material decantado) (21,74 g).

Inicialmente foi realizada uma análise preliminar por CCD com os extratos RPE(1) e RPE(2), a fim de investigar a complexidade dos mesmos e

determinar o melhor sistema de solventes para o fracionamento de ambos. Após esta etapa fez-se o fracionamento dos extratos. As Figuras 7 e 8 apresentam de forma sucinta os procedimentos para os fracionamentos destes extratos.

F) Elaboração do extrato benzênico da raiz

O extrato benzênico da raiz da mucuna-preta foi submetido a uma análise preliminar por CCD, a fim de se investigar a sua complexidade e escolher o sistema de solventes a ser utilizado para o seu fracionamento por cromatografia em coluna (CC).

Após escolha do sistema de solventes [hexano-éter etílico (2:1)], o extrato foi submetido ao fracionamento em coluna, partindo-se do sistema de solventes inicial, seguindo-se a eluição com éter etílico, etanol e, finalmente, metanol.

As frações coletadas, com mesmos valores de R_f , por comparação por CCD, foram reunidas em 11 grupos, sendo aqueles considerados promissores (observando os espectros no infravermelho, o comportamento por CCD e o aspecto físico) submetidos a novos fracionamentos em coluna de sílica-gel, conforme mostrado na Figura 9.

2.2.1. Análise dos constituintes inorgânicos

As frações CPS_1 , CP(1)4-R e RPS_2 foram caracterizadas como sais inorgânicos pela análise de seus espectros no infravermelho. Procedeu-se, então, a análises por emissão atômica para se determinar qual o metal presente nesses compostos (SKOOG, 1991). Fez-se também um teste qualitativo para íons nitrato (o teste do “anel marrom”), que consiste da adição de 3 mL de solução saturada de $FeSO_4$ a 2 mL da solução-teste concentrada, em um tubo de ensaio, seguida da adição lenta, pela borda do tubo, de H_2SO_4 concentrado (VOGEL, 1981).

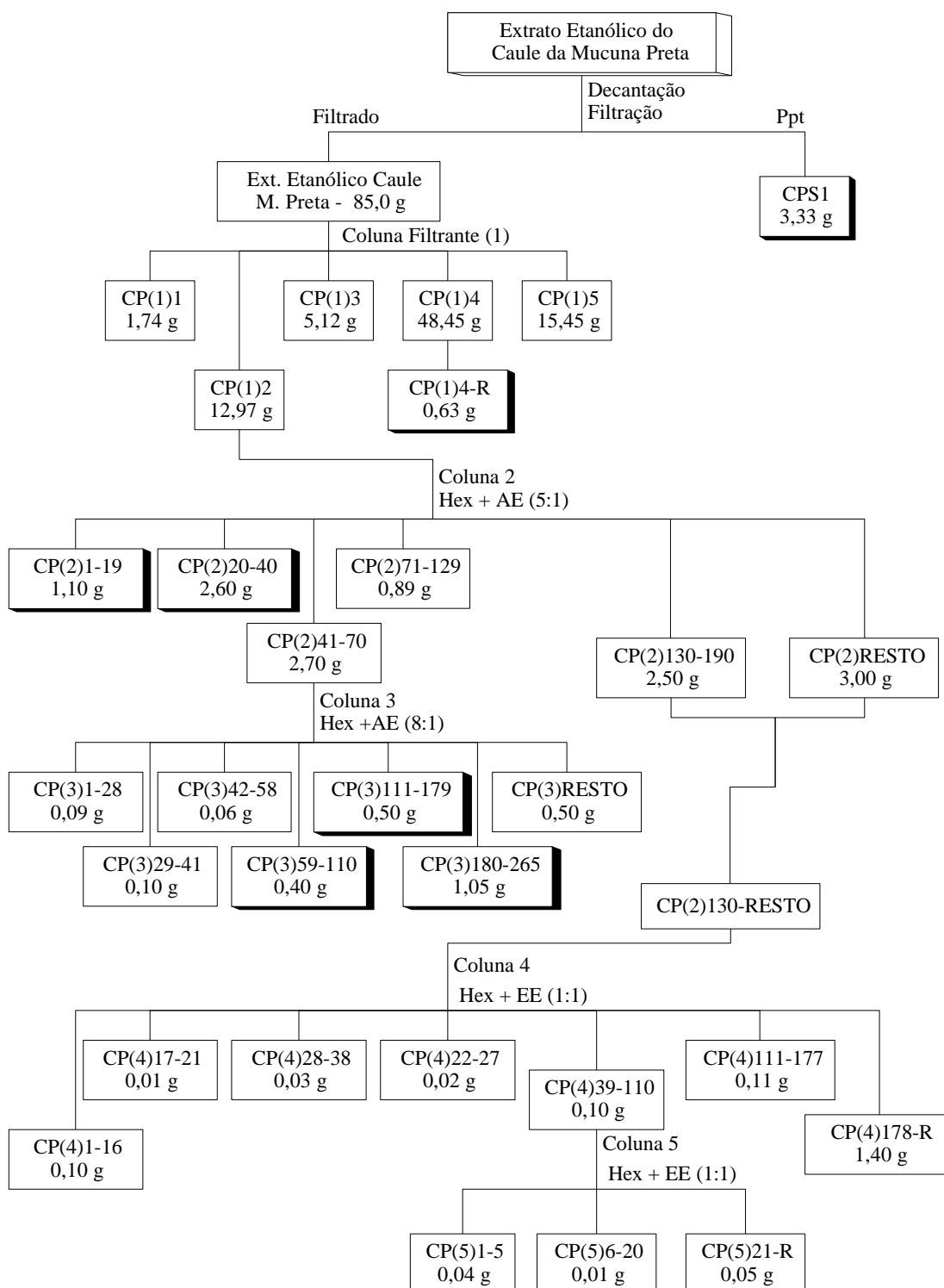


Figura 6 - Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico do caule da mucuna-preta.

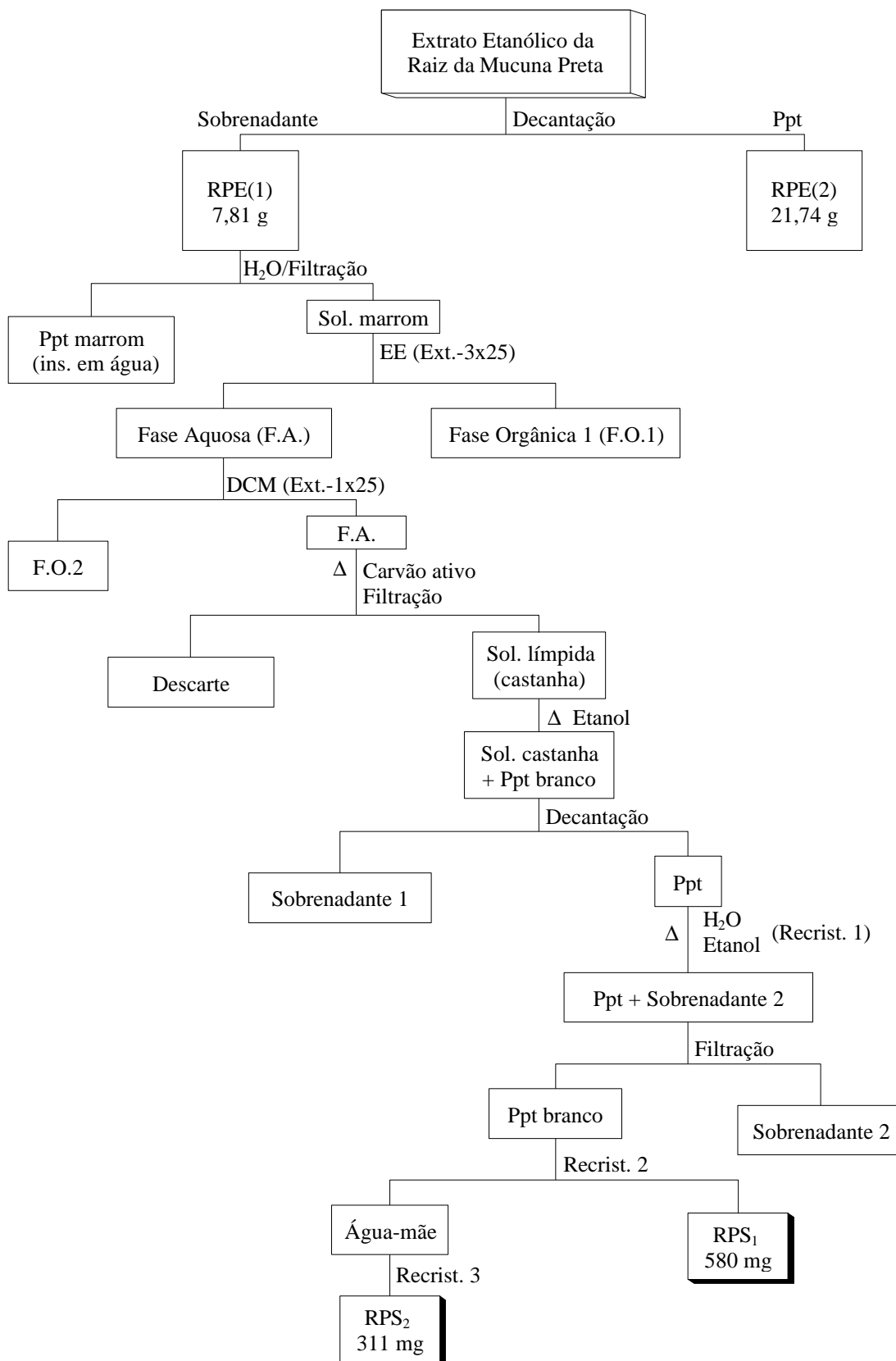


Figura 7 - Fluxograma do fracionamento do material sobrenadante [RPE(1)] do extrato etanólico da raiz da mucuna-preta.

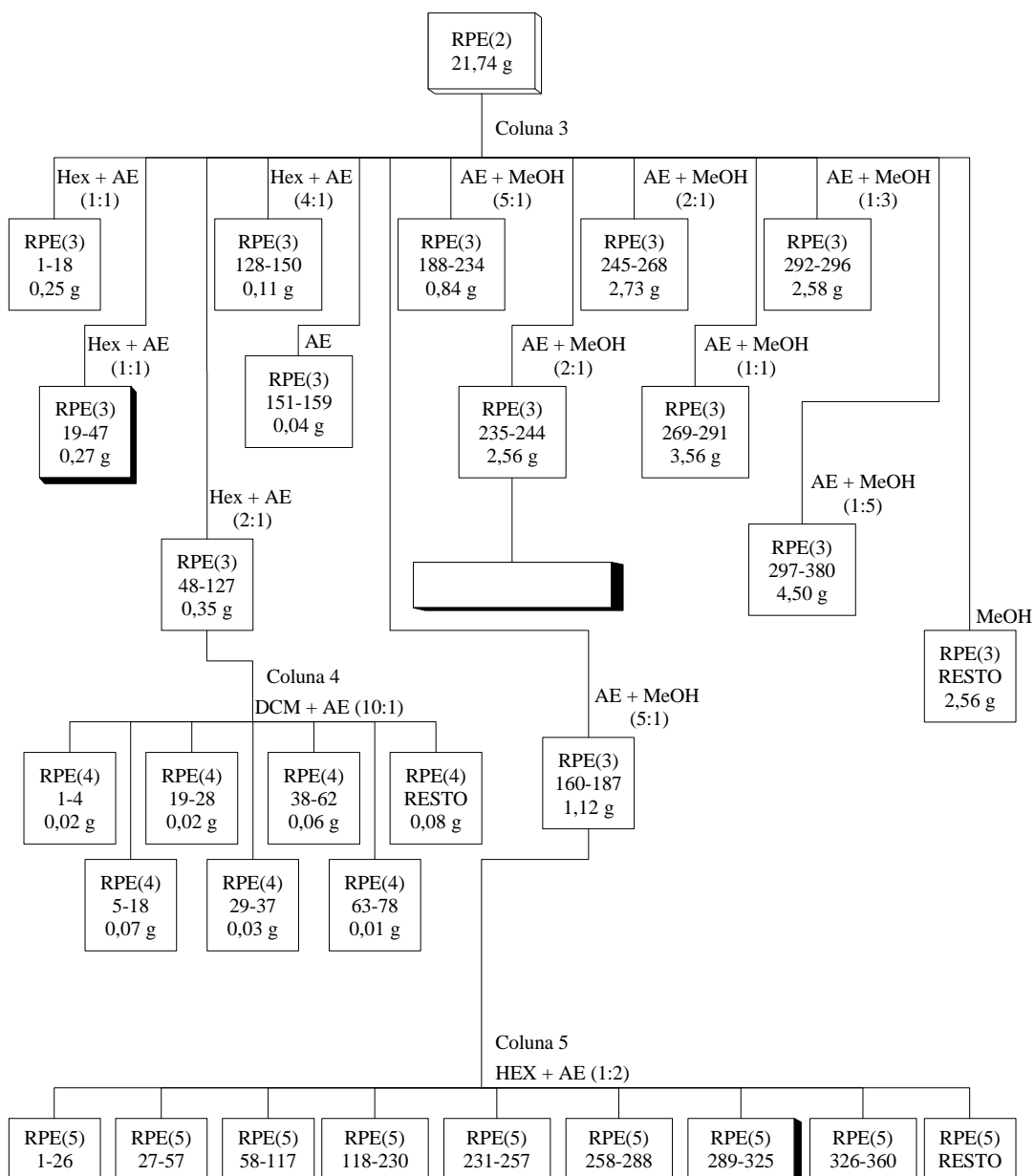


Figura 8 - Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do material decantado [RPE(2)] do extrato etanólico da raiz da mucuna-preta.

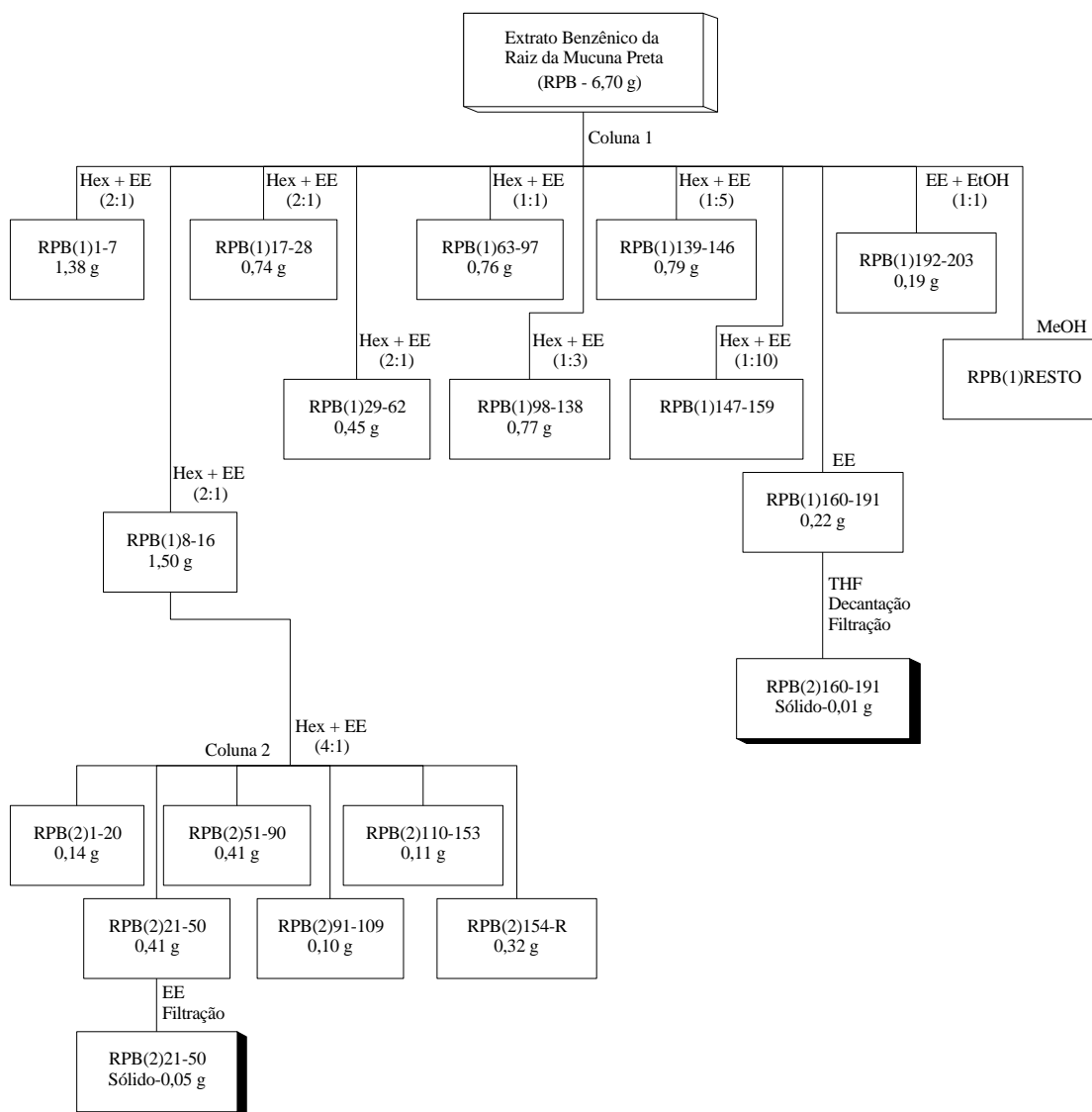


Figura 9 - Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato benzênico da raiz da mucuna-preta.

2.2.2. Análise de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa, das frações obtidas

2.2.2.1. Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando metóxido de sódio/metanol

A fração CP(2)1-19 foi caracterizada, pelo espectro no infravermelho, como sendo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e foi submetida a um processo de transesterificação, para obtenção de seus ésteres metílicos, conforme o seguinte procedimento.

A amostra (20 mg) foi dissolvida em 0,5 mL de THF em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução de metóxido de sódio 0,5 M (preparada a partir de metanol anidro e sódio metálico), sendo o tubo levado ao aquecimento a 50 °C por dez minutos. Adicionaram-se, então, 50 µL de ácido acético glacial e, posteriormente, 3 mL de água. Os ésteres metílicos obtidos foram extraídos com hexano (2 x 5 mL), sendo a fase orgânica secada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), contendo 10 % de carbonato ácido de potássio sólido (KHCO₃), e filtrada. O solvente foi removido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, sendo o material dissolvido em 0,5 mL de hexano, para análise por cromatografia em fase gasosa.

2.2.2.2. Esterificação de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando BF₃/metanol

As frações CP(2)20-40, CP(3)111-179, CP(3)180-265 e RPB(2)21-50 foram caracterizadas como misturas de ácidos graxos, através da análise dos espectros no infravermelho, e foram, por conseguinte, submetidas a um processo de esterificação com trifluoreto de boro (BF₃)/metanol, de acordo com o seguinte procedimento.

Uma amostra (10 mg) de cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de BF₃/metanol (solução a 14 % de BF₃ em metanol, Sigma), em um tubo de ensaio. Aqueceu-se o tubo a 60 °C por dez minutos, resfriou-se o material e procedeu-se à extração com 6 mL de hexano. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (2 x 5 mL), secada com Na₂SO₄ anidro e filtrada, sendo o material resultante concentrado à pressão reduzida. Os ésteres metílicos obtidos foram dissolvidos em 0,5 mL de hexano, para análise por cromatografia em fase gasosa.

2.2.3. Análise da fração RPB(1)160-191

A fração RPB(1)160-191, obtida do extrato benzênico da raiz da mucuna-preta, foi identificada como o daucosterol (β -sitosterol glicosilado), pela análise dos espectros no infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Para a confirmação da identidade desta fração, procedeu-se à hidrólise do material, sendo realizadas análises dessas amostras por CCD e cromatografia em fase gasosa, comparando-se as mesmas com padrões autênticos.

• Hidrólise e análise por CCD da fração RPB(1)160-191:

A uma amostra (5 mg) do material adicionou-se 1 mL da mistura ácido clorídrico (HCl) (36,5 %)/metanol (1:1), em um tubo de ensaio. Em seguida, o tubo foi levado ao aquecimento a 100 °C por 20 minutos. Após resfriamento, o material foi extraído com éter etílico, de modo que o carboidrato ficasse na fase aquosa e o β -sitosterol na fase orgânica.

Após a hidrólise fez-se a análise por CCD (solvente: hexano-éter etílico [1:1]) com a fase orgânica e comparou-se com um padrão.

A fase aquosa também foi submetida a análise, por cromatografia em fase gasosa. Para esta análise a amostra foi submetida à reação de redução e

acetilação, utilizando-se a metodologia proposta por ENGLYST e CUMMINGS (1984), descrita a seguir.

A 1 mL do material hidrolisado (fase aquosa) foram adicionados 0,2 mL de solução 12 mol L^{-1} de amônia e $5 \mu\text{L}$ de octan-2-ol. Após isso, fez-se um teste, utilizando papel indicador de pH, para confirmar a alcalinidade da solução, e, então, fez-se a adição de 0,1 mL de uma solução recém-preparada contendo 100 mg de boroidreto de sódio por mililitro de solução de amônia (3 mol L^{-1}). Homogeneizou-se a mistura e esta foi levada a banho-maria a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, por uma hora, e, em seguida, adicionou-se 0,1 mL de ácido acético glacial. Retirou-se uma alíquota de 0,5 mL desta solução acidificada, fez-se a adição de 0,5 mL de N-metilimidazol e 5 mL de anidrido acético, homogeneizando-se o material. Deixou-se em repouso por dez minutos à temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 0,6 mL de etanol. Após cinco minutos fez-se a adição de 5 mL de água e 5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) $7,5 \text{ mol L}^{-1}$ e, decorridos mais cinco minutos, adicionaram-se outros 5 mL de solução de KOH $7,5 \text{ mol L}^{-1}$, levando à formação de duas fases. Transferiu-se o material para um funil de separação e recolheu-se a fase orgânica, para ser submetida à análise por cromatografia em fase gasosa.

Padrões de glicose, galactose, manose, ramnose, arabinose e xilose foram submetidos ao mesmo procedimento de derivatização descrito para a amostra. A análise cromatográfica foi realizada nas condições descritas na seção “NOTAS”, item 6 (página 22).

2.3. Análise de açúcares, por CCD, das frações RPE(1) e RPE(2)

A análise qualitativa de açúcares nas frações RPE(1) e RPE(2), obtidas do extrato etanólico da raiz da mucuna-preta, foi feita através de CCD, utilizando-se a metodologia proposta por IKAN (1991) para análise de carboidratos.

Placa cromatográfica: sílica-gel (20 x 20 cm).

Solvente: butan-1-ol : ác. acético : éter etílico : água (9:6:3:1).

Revelador: *p*-anissaldeído.

Padrões: glicose, frutose, sacarose, maltose, xilose, ribose, ramnose, celobiose e arabinose.

Tempo de corrida cromatográfica: 03:15 horas.

2.4. Ensaios biológicos - ensaio do tubo invertido

Para que se realizasse a avaliação da atividade nematicida das frações isoladas utilizou-se outro bioensaio, o ensaio do tubo invertido (TSAI et al., 1991).

2.4.1. Preparo das amostras

As amostras utilizadas neste ensaio biológico foram obtidas pela solubilização das mesmas em metanol, de modo que a concentração final de cada amostra ensaiada fosse de 50 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de acordo com o ensaio a ser realizado, levando-se em consideração o fator de diluição, quando da montagem do experimento (fator de diluição = 25).

Para tanto, no ensaio com as amostras em uma concentração final de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram utilizadas amostras com uma concentração de 1,25 mg mL^{-1} , do mesmo modo que, para as amostras em uma concentração final de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram utilizadas amostras com uma concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.2. Preparo da suspensão de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3

A suspensão aquosa de *Meloidogyne incognita* raça 3 foi obtida através da eclosão de massas de ovos multiplicadas em tomateiros cv. Santa Cruz, armazenados em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV. Após a eclosão dos juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3 no 2^o estágio, fez-se

uma suspensão aquosa destes e, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, padronizou-se esta suspensão (800 nematóides por mililitro).

2.4.3. Montagem dos ensaios biológicos

Estes ensaios foram feitos variando-se as concentrações das amostras testadas. Em um primeiro ensaio foram utilizadas amostras com concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo, no segundo ensaio, utilizada a concentração final de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a montagem destes ensaios biológicos seguiu-se a seguinte metodologia, proposta por TSAI et al. (1991).

Retirou-se 0,1 mL de cada amostra a ser ensaiada e transferiu-se para tubos (5 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro), com 1,9 mL de solução a 0,1 % do detergente tween 20, adicionando-se 0,5 mL da suspensão aquosa de nematóides (aproximadamente 400 nematóides) em cada tubo. Fez-se um branco (experimento-controle) com 0,1 mL de metanol. Em seguida, os tubos foram selados com lenço de papel facial e incubados no escuro a 26°C , por 48 horas. Após estas 48 horas, os tubos foram invertidos em placas de Petri (5 cm de diâmetro, aproximadamente) contendo 5 mL de solução de sulfato de estreptomicina (antibiótico utilizado para assegurar a não-interferência de fatores externos), a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e novamente incubados por 48 horas a 26°C , no escuro. Após estas 48 horas, fez-se a contagem dos nematóides com o auxílio de uma lupa. Nesta contagem, todo nematóide visualizado foi considerado vivo.

A atividade nematicida é expressa em porcentagem de mortalidade, pela seguinte equação:

$$\text{Mortalidade (\%)} = (B - A) / B \times 100$$

em que B = número de nematóides vivos no branco; e

A = número de nematóides vivos nas amostras.

Para cada tratamento foram realizadas seis repetições, sendo feitas duas contagens em cada repetição. A Figura 10 ilustra a montagem do ensaio do tubo invertido.

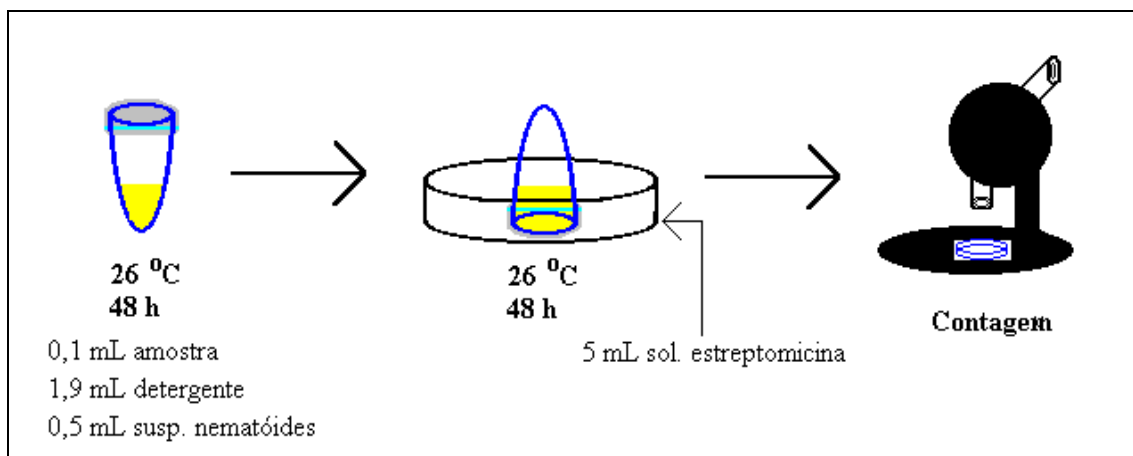


Figura 10 - Esquema da montagem utilizada no ensaio do tubo invertido.

Nesses ensaios biológicos, além do branco e das amostras isoladas no fracionamento dos extratos, utilizou-se o mesmo procedimento para compostos padrões, sendo estes: L-dopa, ácido caprílico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linolênico, palmitato de metila e estearato de metila.

Todos os resultados obtidos nos ensaios biológicos foram analisados estatisticamente, utilizando o teste F (a 5 %) para análise de variância e o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott (também a 5 %), estando ambos os testes inseridos no programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas em Genética), disponível no servidor (Central de Processamento de Dados - CPD) da UFV e amplamente utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio das placas de incubação - avaliação do efeito dos extratos brutos da mucuna-preta sobre a eclosão de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3

Nesta avaliação, utilizando a técnica de incubação em placas de Petri (NOGUEIRA, 1994), observou-se que os extratos etanólicos brutos a quente e a frio da parte aérea (folha + caule) e da raiz da mucuna-preta inibiram a eclosão de juvenis do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3, e os nematóides visualizados, em sua maior parte, estavam estirados. Os extratos que apresentaram maior taxa de inibição foram os da raiz, tanto a quente quanto a frio, mas os extratos da parte aérea também apresentaram boa taxa de inibição (Quadro 1 e Figura 11).

Pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott, foram observados cinco grupos distintos (Quadro 1). Esses resultados mostram que parece ocorrer uma diminuição na atividade dos extratos quando estes são obtidos a quente. Isto poderia ser devido à instabilidade térmica, volatilização ou decomposição de algum composto durante o processo de aquecimento para a obtenção do extrato a quente. Apesar desses resultados, os extratos para o fracionamento foram obtidos a quente, por ser este um processo mais rápido. Neste caso, quando da

concentração (eliminação do solvente) dos extratos brutos, tomou-se o cuidado de se trabalhar com temperaturas inferiores a 50 °C, sob pressão reduzida, no evaporador rotatório.

Além disso, decidiu-se não trabalhar com a parte aérea como um todo (caule + folha), já que o teor de clorofila presente na folha é muito grande, o que dificultaria o processo de isolamento dos constituintes químicos. Com isto fez-se o extrato etanólico do caule isoladamente, além dos extratos benzênico e etanólico da raiz.

Baseado nesses resultados pôde-se confirmar a atividade de inibição dos extratos brutos da mucuna-preta sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3 (Quadro 1).

Quadro 1 - Ensaio das placas de incubação - número de juvenis de 2º estágio eclodidos das massas de ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3 após exposição aos extratos brutos de mucuna-preta

Extratos da mucuna-preta	Número médio de juvenis eclodidos*	% de Inibição (em relação ao branco)
Branco	429,87 A**	0
Parte Aérea (a quente)	239,33 B	44,3
Parte Aérea (a frio)	222,67 C	48,2
Raiz (a quente)	216,20 D	49,7
Raiz (a frio)	153,43 E	64,3

* - Médias de três contagens (quatro repetições por contagem).

** - As médias seguidas pela mesma letra são iguais entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

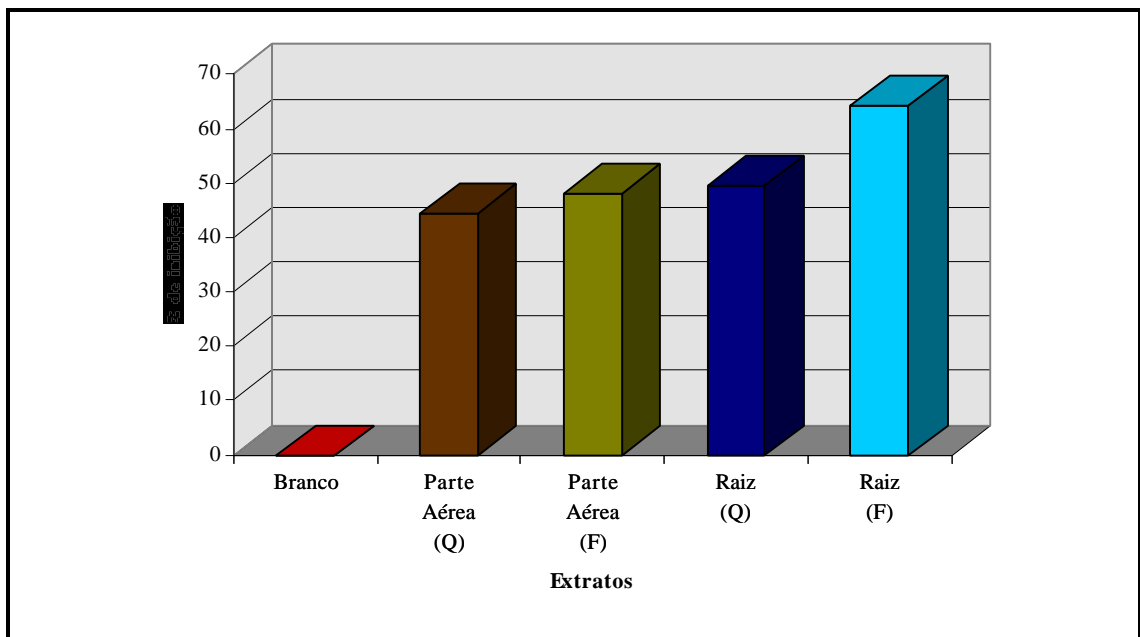


Figura 11 - Porcentagem de inibição dos extratos brutos de mucuna-preta sobre a eclosão de juvenis de 2º estágio das massas de ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3, em relação ao branco.

3.2. Isolamento dos constituintes da mucuna-preta (*Mucuna aterrima*): caracterização e identificação

O fracionamento do extrato etanólico do caule e dos extratos etanólico e benzênico da raiz da mucuna-preta resultaram na obtenção de várias frações, sendo o estudo destas realizado inicialmente com as mais promissoras, baseando-se em uma caracterização preliminar pelos espectros no infravermelho, bem como em sua análise por CCD.

A identificação das frações baseou-se nos espectros no infravermelho, de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13, assim como nos demais dados experimentais (ponto de fusão, análise por emissão atômica e cromatografia em camada delgada e em fase gasosa). O Quadro 2 apresenta os constituintes químicos isolados do caule e da raiz da mucuna-preta.

3.2.1. Constituintes inorgânicos

As frações CPS₁, CP(1)4-R e RPS₂, cujos aspecto físico (cristais brancos) e solubilidade (solúveis em água, mas pouco solúveis em metanol) foram semelhantes, apresentaram espectro no infravermelho idênticos, como exemplificado nas Figuras 12 e 13, tendo absorções principais em 1.380 e 820 cm⁻¹ (ν N-O), características de compostos contendo o ânion nitrato (NO₃⁻). O teste qualitativo do anel marrom (utilizando FeSO₄ e H₂SO₄) (VOGEL, 1981) confirmou a presença do íon NO₃⁻ nessas amostras.

Utilizando a espectrofotometria de emissão atômica determinou-se a presença dos cátions sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), sendo também obtidas suas proporções nessas amostras (Quadro 3). Com esses resultados confirmou-se a presença dos sais nitrato de sódio (NaNO₃) e nitrato de potássio (KNO₃), sendo a ocorrência do último predominante em relação ao primeiro.

Quadro 2 - Constituintes químicos isolados do caule e da raiz da mucuna-preta

CONSTITUINTE	FRAÇÕES	CAULE	RAIZ
Sais inorgânicos (KNO ₃ e NaNO ₃)	CPS ₁	3,33 g	----
	CP(1)4-R	0,83 g	----
	RPS ₂	----	0,31 g
Mistura de ésteres de ácidos graxos	CP(2)1-19	1,10 g	----
Mistura de ácidos graxos	a) CP(2)20-40	2,60 g	----
	CP(3)111-179	0,50 g	----
	CP(3)180-265	1,05 g	----
	b) RPB(2)21-50	----	0,05 g
β-sitosterol e estigmasterol	CP(3)59-110	0,40 g	----
	RPE(3)19-47	----	0,27 g
	RPB(1)17-28	----	0,74 g
Alantoína	RPS ₁	----	0,58 g
	RPE(3)235-244	----	0,11 g
Álcool não- identificado	RPE(5)289-325	----	0,05 g
β-sitosterol D-glic. (daucosterol) e estigmasterol D-glic.	RPB(1)160-191	----	0,01 g

O ânion nitrato presente no solo pode ser proveniente de um processo de nitrificação ou de sua utilização como adubo, sendo absorvido pelas plantas, onde é convertido em proteínas e outros produtos nitrogenados, como aminoácidos e alcalóides.

A grande quantidade de nitrato encontrada na mucuna-preta pode ser explicada pela característica da planta, já que se trata de uma leguminosa com alto poder de fixação de nitrogênio.

Quadro 3 - Porcentagem de sódio e potássio nos sais de nitrato isolados da mucuna-preta, determinados por espectrofotometria de emissão atômica

AMOSTRA	Na ⁺ : K ⁺ (%)
CPS ₁	40 : 60
CP(1)4-R	25 : 75
RPS ₂	33,3 : 66,7

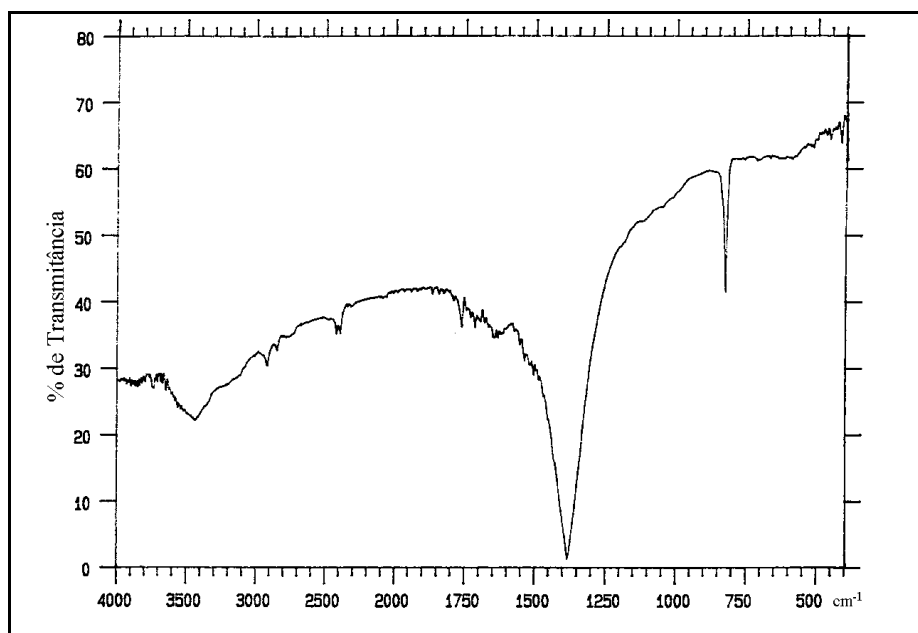


Figura 12 - Espectro no infravermelho da fração CPS₁.

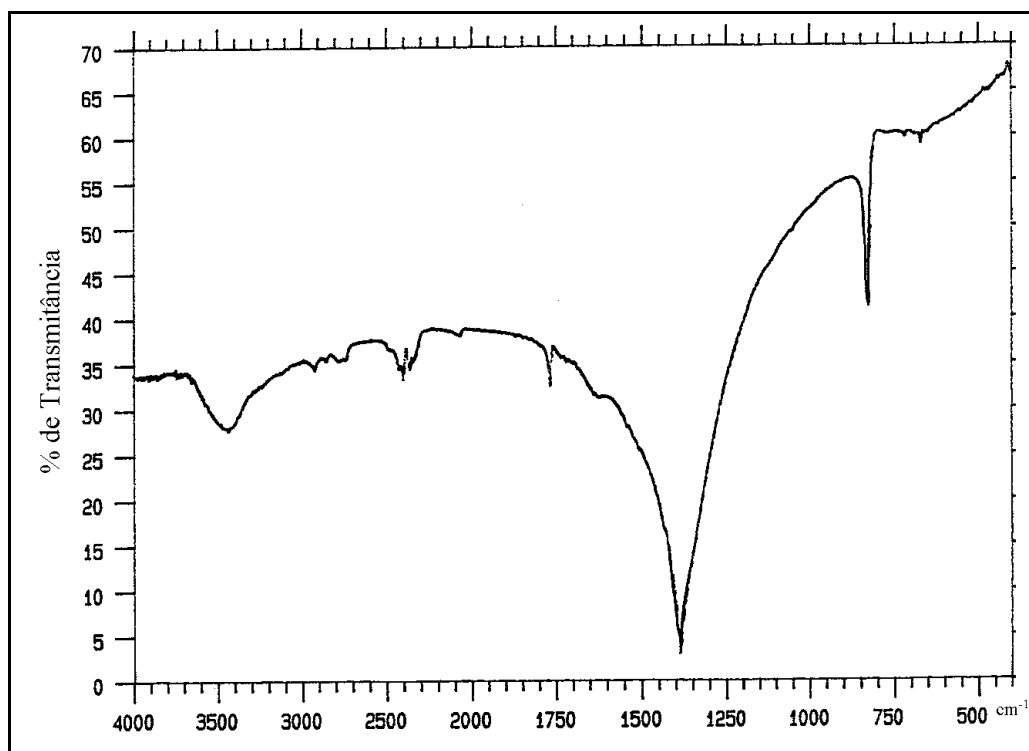


Figura 13 - Espectro no infravermelho da fração RPS₂.

3.2.2. Ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos

3.2.2.1. Mistura de ésteres de ácidos graxos

O espectro no infravermelho da fração CP(2)1-19 (Figura 14) apresentou absorções em 3.010 (ν =C-H), 2.920 e 2.855 (ν C-H), 1.740 (ν C=O de éster), 1.470 e 1.385 (δ_s C-H), 1.170 (ν C-O de éster) e 720 cm^{-1} [δ_s (CH₂)_n; n > 4].

De acordo com a análise do espectro no infravermelho, característico de éster, resolveu-se fazer a transesterificação dos constituintes dessa fração, utilizando MeONa/MeOH. Após reação de transesterificação, estes constituintes foram identificados por cromatografia em fase gasosa, através de comparação dos tempos de retenção destes ésteres metílicos com padrões, e, em seguida, confirmados através de coinjeção da amostra com diversos padrões (Quadro 4).

O cromatograma obtido para a fração CP(2)1-19 (Figura 15) levou à identificação de uma mistura contendo cinco ésteres metílicos de ácidos graxos: miristato (C14:0), palmitato (C16:0), estearato (C18:0), oleato (C18:1) e linoleato de metila (C18:2). As porcentagens relativas de cada um destes ésteres foram calculadas em relação à área do pico, sendo estas: 0,74; 47,5; 32,8; 14,4 e 4,55 %, respectivamente.

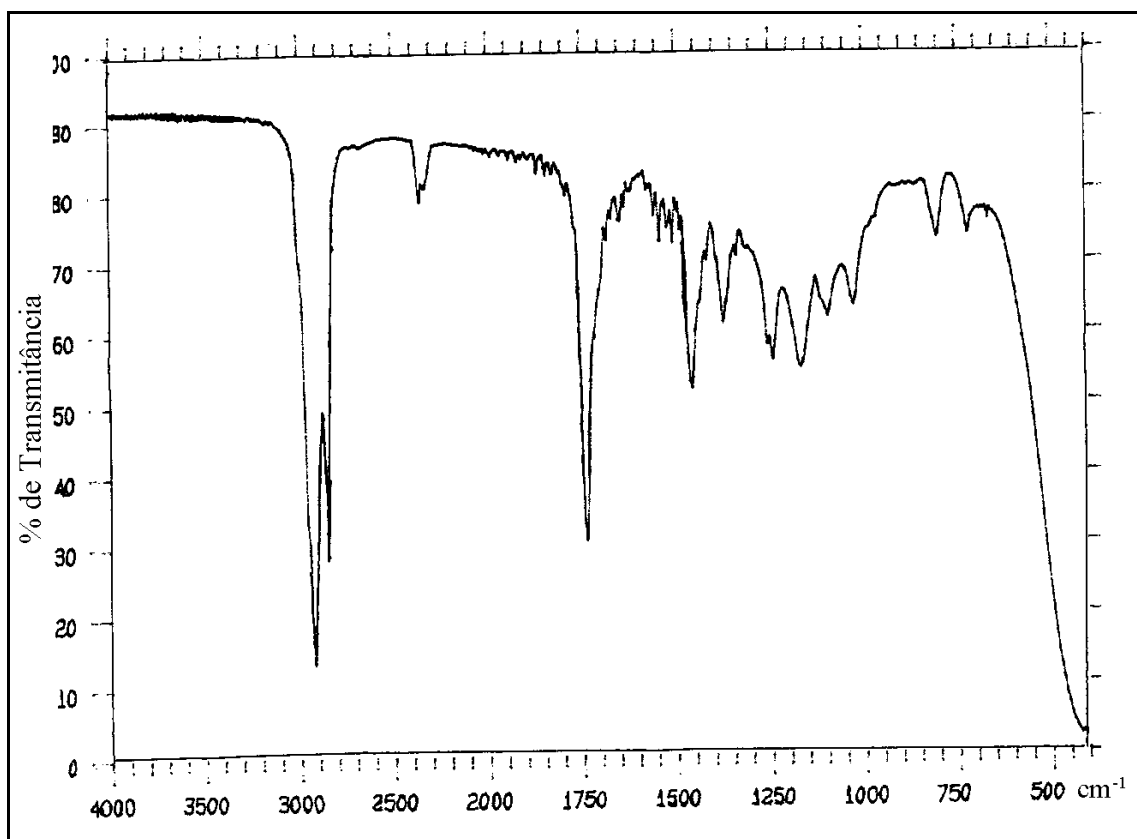


Figura 14 - Espectro no infravermelho da fração CP(2)1-19.

Quadro 4 - Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e os da amostra CP(2)1-19

PADRÕES	TEMPOS DE RETENÇÃO (minutos)	
	PADRÕES	CP(2)1-19
C14:0	8,35	8,16
C16:0	11,61	11,87
C18:0	16,44	16,14
C18:1	16,93	16,85
C18:2	17,91	18,18
C18:3	21,05	----
C22:1	43,35	----

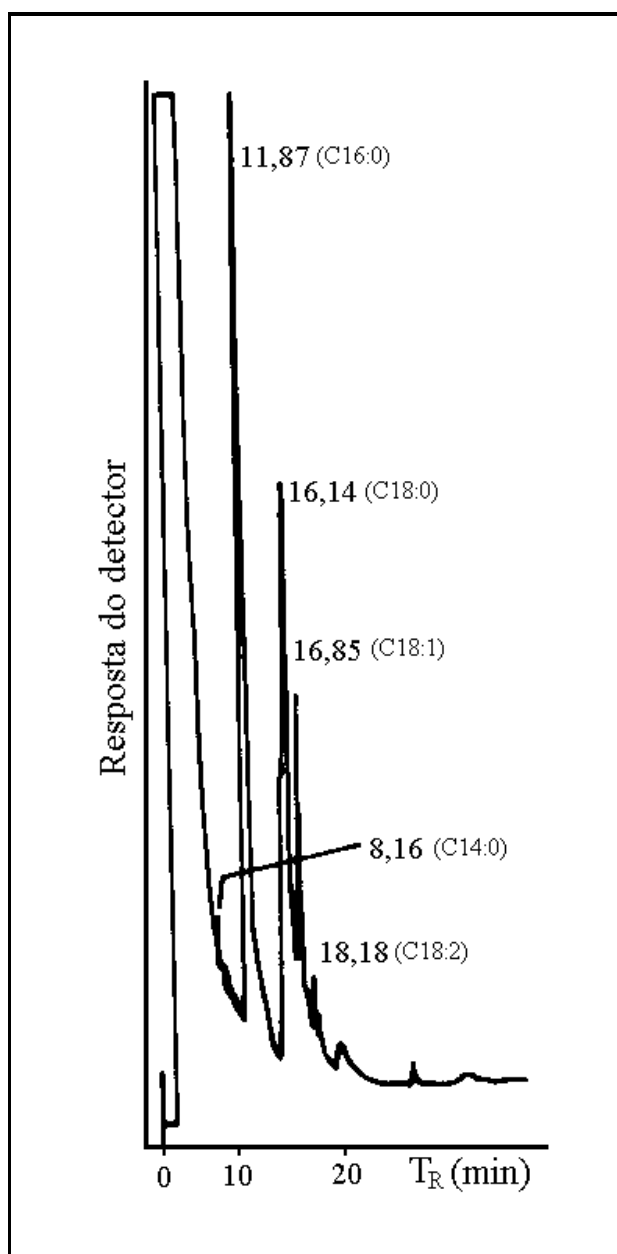


Figura 15 - Cromatograma dos ésteres metílicos da fração CP(2)1-19.

3.2.2.2. Mistura de Ácidos Graxos

A) CP(2)20-40, CP(3)111-179 e CP(3)180-265

As frações CP(2)20-40, CP(3)111-179 e CP(3)180-265 apresentaram espectros no infravermelho semelhantes, como o apresentado na Figura 16, característico de ácidos graxos, com uma banda de absorção entre 3.600 e 2.500 cm^{-1} (ν O-H) e absorções em 2.920 e 2.850 (ν C-H), 1.700 (ν C=O), 1.470 (δ_s C-H) e 720 cm^{-1} [δ_s (CH₂)_n; n > 4].

Com esses resultados, procedeu-se à esterificação dessas frações, utilizando BF₃/MeOH, para a posterior análise por cromatografia em fase gasosa. Pelos cromatogramas obtidos (Figura 17) e de posse dos tempos de retenção dos padrões (Quadro 5), verificou-se a presença dos ácidos palmítico (C16:0, porcentagem relativa: 68,6 %), oléico (C18:1, 21,8 %) e linoléico (C18:2, 9,6 %), na fração CP(2)20-40; ácidos palmítico (80,6 %), esteárico (C18:0, 11,0 %) e oléico (8,4 %), na fração CP(3)111-179; e ácidos palmítico (82,1 %) e esteárico (17,9 %), na fração CP(3)180-265.

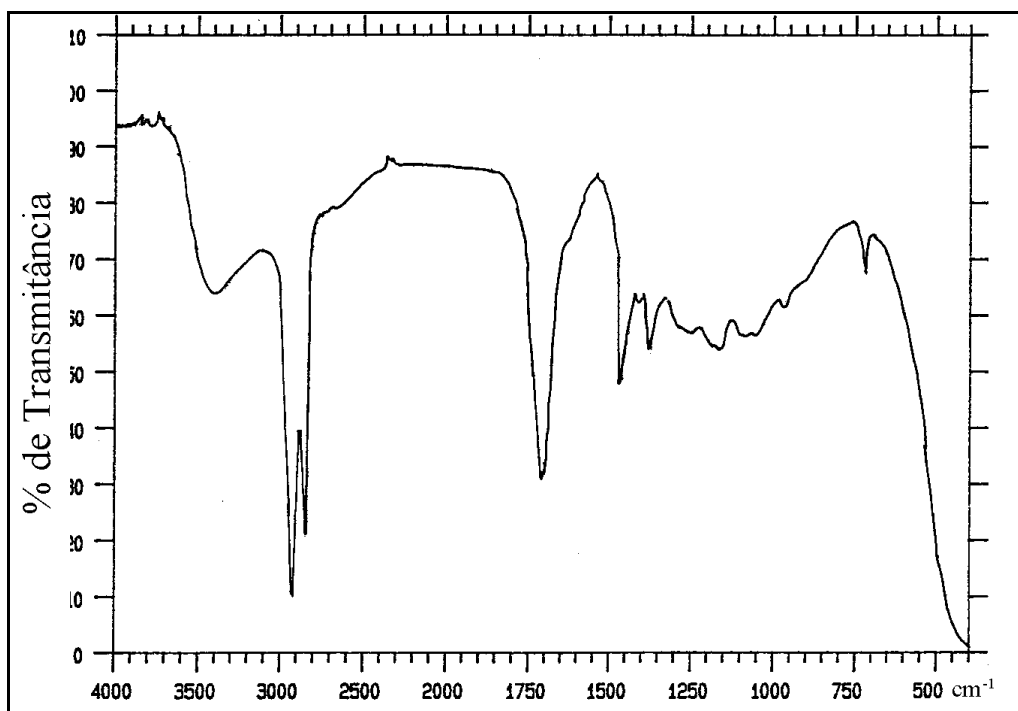


Figura 16 - Espectro no infravermelho da fração CP(3)111-179.

Quadro 5 - Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e das amostras

PADRÕES	TEMPOS DE RETENÇÃO (minutos)			
	PADRÕES	CP(2)20-40	CP(3)111-179	CP(3)180-265
Nº de C:Insaturações				
C14:0	8,35	----	----	----
C16:0	11,61	11,40	11,39	11,39
C18:0	16,44	----	15,80	15,81
C18:1	16,93	16,48	16,34	----
C18:2	17,91	17,99	----	----
C18:3	21,05	----	----	----
C22:1	43,35	----	----	----

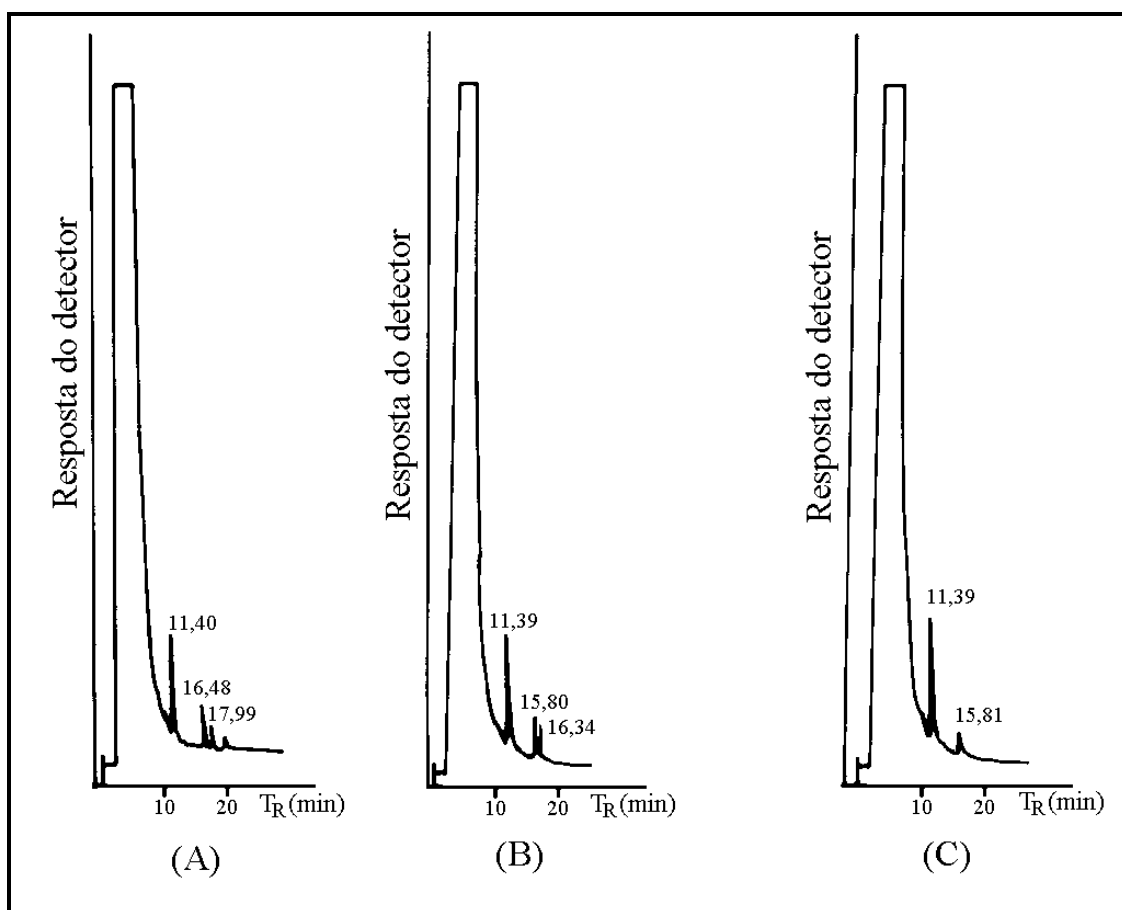


Figura 17 - Cromatogramas dos ésteres metílicos das frações CP(2)20-40 (A), CP(3)111-179 (B) e CP(3)180-265 (C).

B) RPB(2)21-50

A fração RPB(2)21-50 também apresentou um espectro no infravermelho característico de ácido graxo (Figura 18), com uma banda de absorção entre 3.600 e 2.500 cm^{-1} (ν O-H) e absorções em 2.920 e 2.850 (ν C-H), 1.700 (ν C=O), 1.460 e 1.400 (δ_s C-H) e 720 cm^{-1} [δ_s $(\text{CH}_2)_n$; $n > 4$]. Esta fração foi obtida como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão de 74-75 $^\circ\text{C}$, o que sugeriu tratar-se de uma substância pura.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 19) confirmou a natureza alifática da substância, uma vez que apresentou sinais em δ 0,88 (t, $-\text{CH}_3$ terminal, alifático), δ 1,25 [m, $-(\text{CH}_2)_n$, com $n = 22$], δ 1,63 (quinteto, $-\text{CH}_2$ β à carboxila) e δ 2,34 (t, $-\text{CH}_2$ α à carboxila), compatíveis com valores descritos em tabelas da literatura (SILVERSTEIN et al., 1991). Vale ressaltar que, baseando-se apenas nos dados do ponto de fusão, IV e RMN de hidrogênio, o composto estaria puro e tratar-se-ia, pela integração dos sinais no espectro de RMN de hidrogênio, do ácido tetracosanóico (C24:0, ác.lignocérico - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$).

Para avaliação do grau de pureza da fração RPB(2)21-50, fez-se a esterificação da mesma e procedeu-se à análise por cromatografia em fase gasosa. Após a obtenção do cromatograma (Figura 20), verificou-se que esta fração tratava-se de uma mistura de ácidos graxos, que foram identificados através da comparação com padrões (Quadro 6). Pelo resultado, observou-se que, realmente, o principal componente da mistura é o ácido lignocérico (35,2 %), mas esta continha também os ácidos tricosanóico (C23:0, 17,1 %) e docosanóico (C22:0, ác. behênico, 12,7 %) e, ainda, em menores quantidades, os ácidos palmítico (1,6 %), esteárico (2,1 %), icosanóico (C20:0, ác. araquídico, 1,9 %) e henicosanóico (C21:0, 1,0 %). Foram observados ainda dois picos, em 28,47 e 36,97 minutos, os quais não foram identificados devido à falta de padrões de ésteres metílicos com cadeias maiores.

Um fato interessante na análise dessa fração foi a revelação de que se tratava de uma mistura de ácidos graxos, já que pelo espectro de RMN de ^1H o composto parecia estar puro e seria o ácido lignocérico, o que não se confirmou ao se proceder à análise cromatográfica em fase gasosa. Este fato demonstra que a análise de substâncias orgânicas graxas apenas por RMN não é suficiente para a avaliação do grau de pureza.

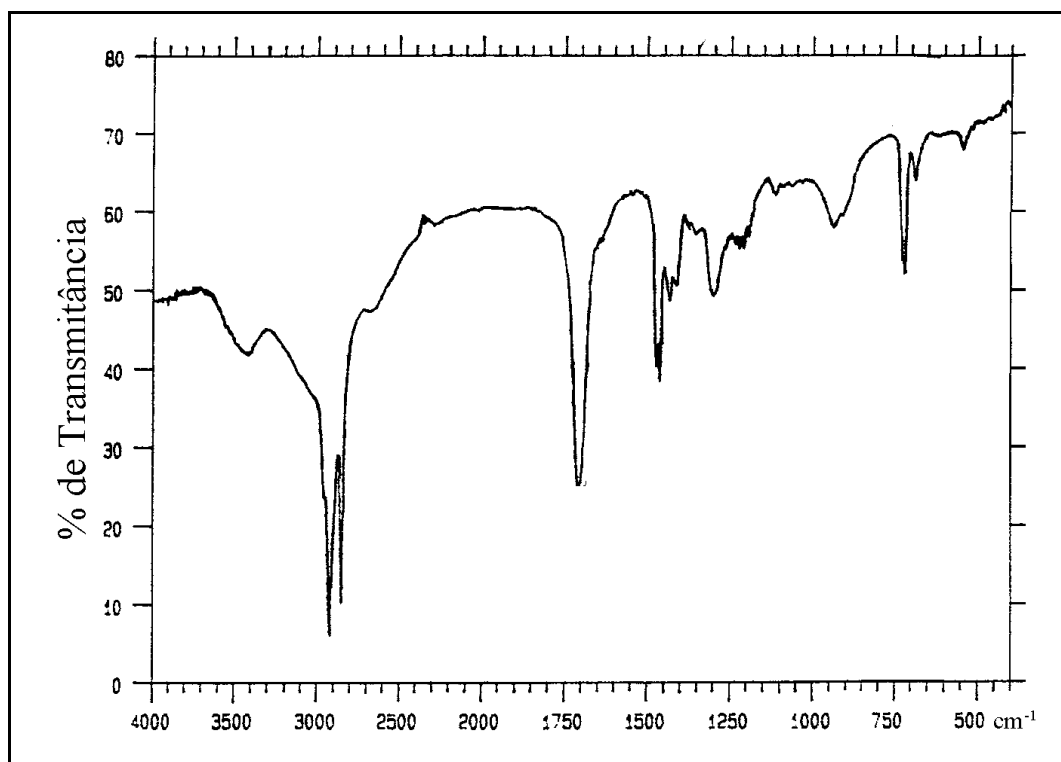


Figura 18 - Espectro no infravermelho da fração RPB(2)21-50.

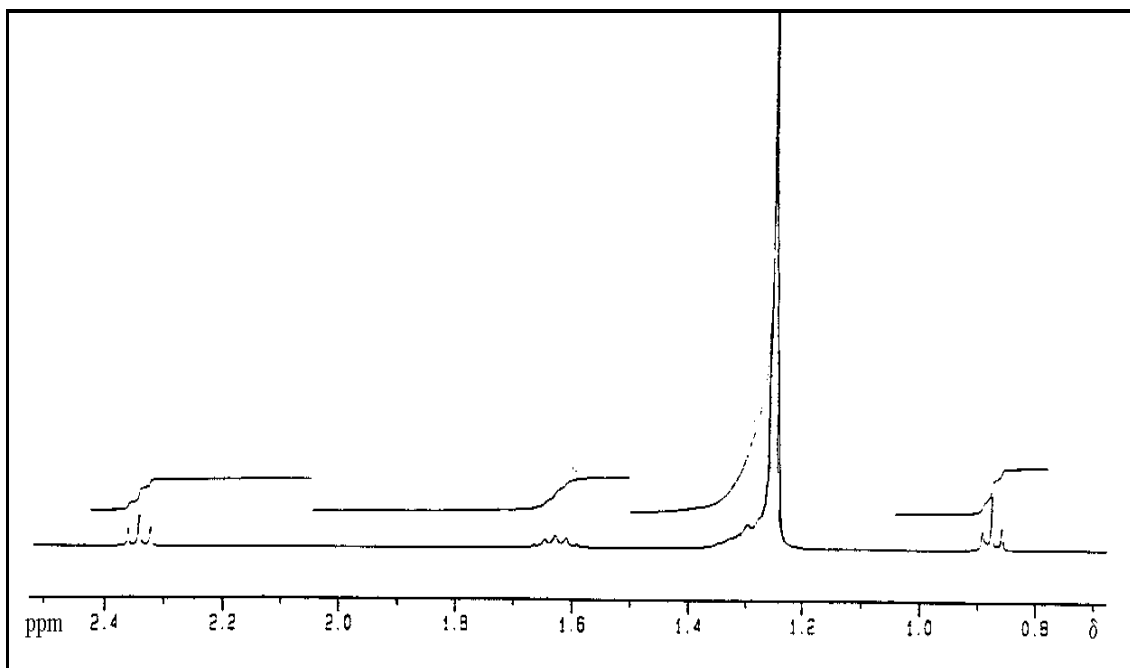


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração RPB(2)21-50.

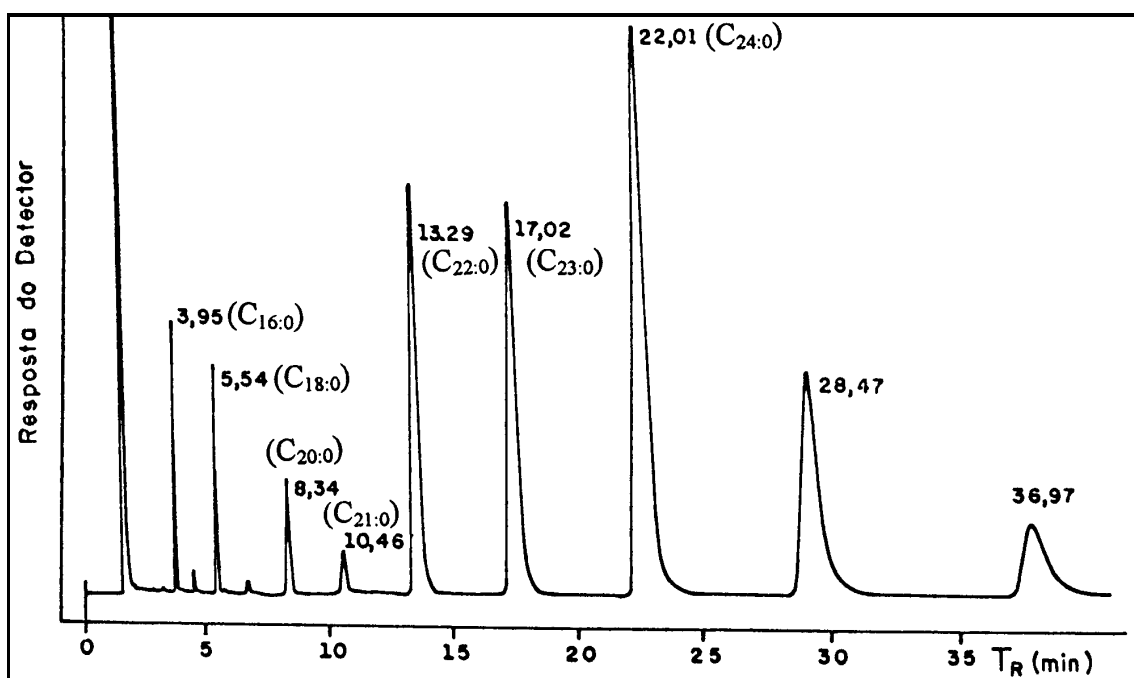


Figura 20 - Cromatograma dos ésteres metílicos da fração RPB(2)21-50.

Quadro 6 - Tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos e os da fração RPB(2)21-50

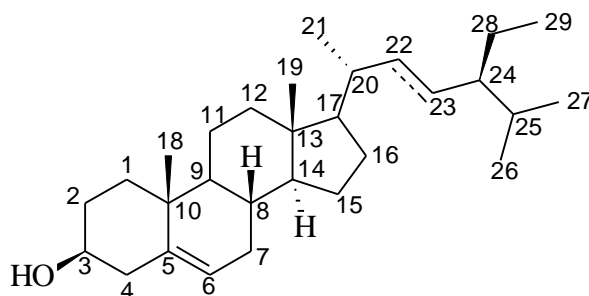
PADRÕES	TEMPOS DE RETENÇÃO (minutos)	
	PADRÕES	RPB(2)21-50
Nº de C : Insaturações		
C16:0	3,93	3,95
C18:0	5,50	5,54
C18:1	5,78	----
C18:2	6,34	----
C18:3	7,24	----
C20:0	8,35	8,34
C21:0	10,46	10,46
C22:0	13,34	13,29
C23:0	17,03	17,02
C24:0	21,93	22,01
*	----	28,47
*	----	36,97

* - Estes ácidos não foram identificados devido à falta de padrões.

A análise dos resultados obtidos por cromatografia em fase gasosa indicou que o principal ácido graxo presente no caule da mucuna-preta [frações CP(2)20-40, CP(3)111-179 e CP(3)180-265] é o ácido palmítico, o mesmo resultado ocorrendo na forma de ésteres (palmitato) [fração CP(2)20-40]. Já na raiz, a análise da fração RPB(2)21-50 mostrou que o principal constituinte é o ácido lignocérico.

Vale ressaltar que várias outras frações apresentaram características de material graxo, de acordo com a análise de seus espectros no infravermelho, o que mostra que a mucuna-preta apresenta um alto teor de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos dentre seus metabólitos secundários. No extrato etanólico do caule obteve-se um teor aproximado de 6-8 %, em massa, de frações contendo ácidos e seus ésteres.

3.2.3. Mistura de β -sitosterol e estigmasterol



22,23-diidro: β -sitosterol [52]
 Δ 22: estigmasterol [53]

O espectro no infravermelho da fração CP(3)59-110 (Figura 21), isolada na forma de um sólido cristalino, apresentou absorções em 2.970, 2.930 e 2.875 (ν C-H), 1.470 e 1.390 cm^{-1} (δ_s C-H), que caracterizam a natureza alifática do constituinte desta fração. As absorções em 3.420 (ν O-H) e 1.070 cm^{-1} (ν C-O) foram indicativas da presença de hidroxila alcoólica, e as bandas de absorção em 1.640 (ν C=C) e 800 cm^{-1} (δ_s =C-H) indicam a presença de dupla ligação.

Comparando-se o espectro no infravermelho desta fração com dados obtidos na literatura (DE PAULA, 1994), observou-se a semelhança entre este espectro e o obtido para uma mistura de β -sitosterol [52] e estigmasterol [53].

A análise do espectro de RMN de hidrogênio dessa fração (Figura 22) permitiu observar a presença de sinais referentes a hidrogênios olefínicos do estigmasterol, H-22 (1H, δ 5,14, dd, $J = 8,6/15,2$ Hz) e H-23 (1H, δ 5,00, dd, $J = 8,7/15,2$ Hz), que, associada à integração dos sinais, indicou se tratar de uma mistura. Outros sinais característicos destes dois esteróides foram aqueles de H-6 (H, δ 5,33, d, $J = 5,3$ Hz) e H-3 (H, δ 3,51, m).

O espectro de massas (Figura 23) auxiliou na caracterização desta fração, mostrando o pico do íon molecular em m/z 414, compatível com a fórmula $C_{29}H_{50}O$ do β -sitosterol, e apresentou o pico-base em m/z 396, obtido devido à perda de uma molécula de água. Outros picos também foram registrados, como aqueles em m/z 255, 145, 107, 95, 81, 55 e 43, compatíveis com a fragmentação de esteróides. A presença do estigmasterol, além do β -sitosterol, foi indicada pela presença de fragmentos característicos dessa mistura em m/z 412 (pico do íon molecular do estigmasterol), 397, 396, 395 e 394 (MISRA e TIWARI, 1973).

Além dos dados espectroscópicos mencionados, determinou-se o ponto de fusão da fração CP(3)59-110, sendo este 145,5-147,5 °C, o que está de acordo com os valores encontrados na literatura (BEZERRA et al., 1994). Essa pequena diferença é perfeitamente aceitável, sobretudo em se tratando de uma mistura e levando-se em conta o solvente utilizado para a recristalização do material.

Fez-se, ainda, análise por CCD, solvente hexano e éter etílico (1:1), para comparação da amostra com um padrão (mistura de β -sitosterol e estigmasterol), sendo os valores de R_f idênticos (0,45).

Através da análise do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dessa fração, foi possível estimar o teor de cada constituinte, sendo 40 % de β -sitosterol e 60 % de estigmasterol.

As frações RPE(3)19-47 e RPB(1)17-28 apresentaram-se idênticas à fração CP(3)59-110, por comparação através de CCD e de seus espectros no infravermelho, tratando-se também de misturas de β -sitosterol e estigmasterol.

Esses compostos isolados na mucuna-preta são amplamente distribuídos em plantas e, não raramente, são obtidos na forma de misturas, haja vista a dificuldade de separação desses esteróides, devido à grande semelhança entre suas propriedades químicas e físicas.

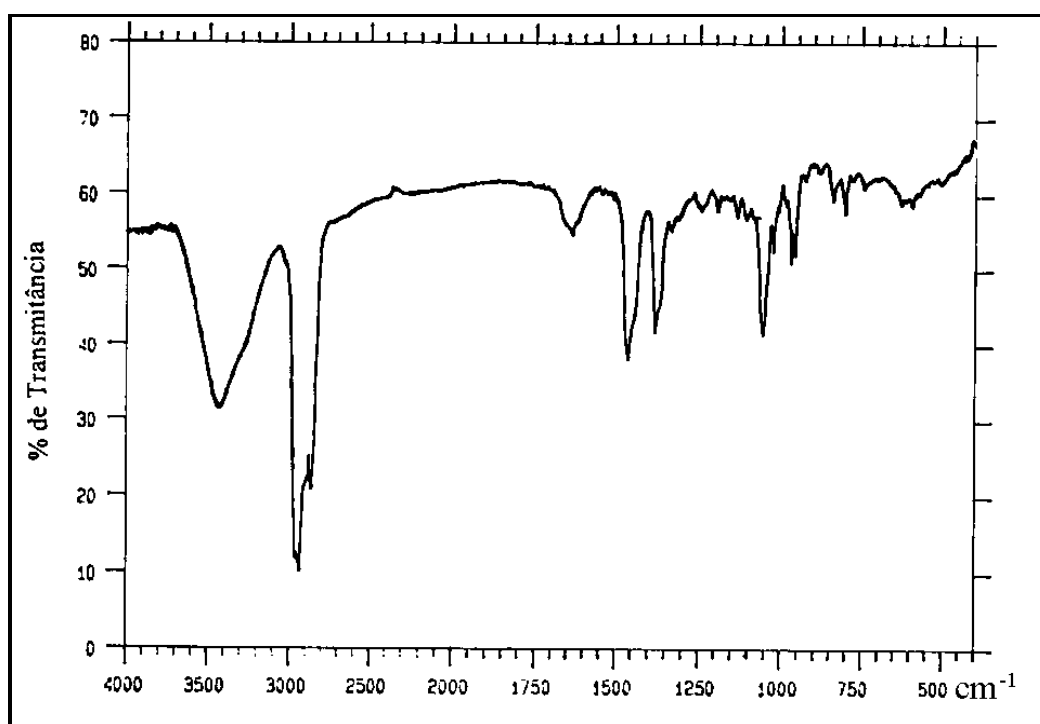


Figura 21 - Espectro no infravermelho da fração CP(3)59-110.

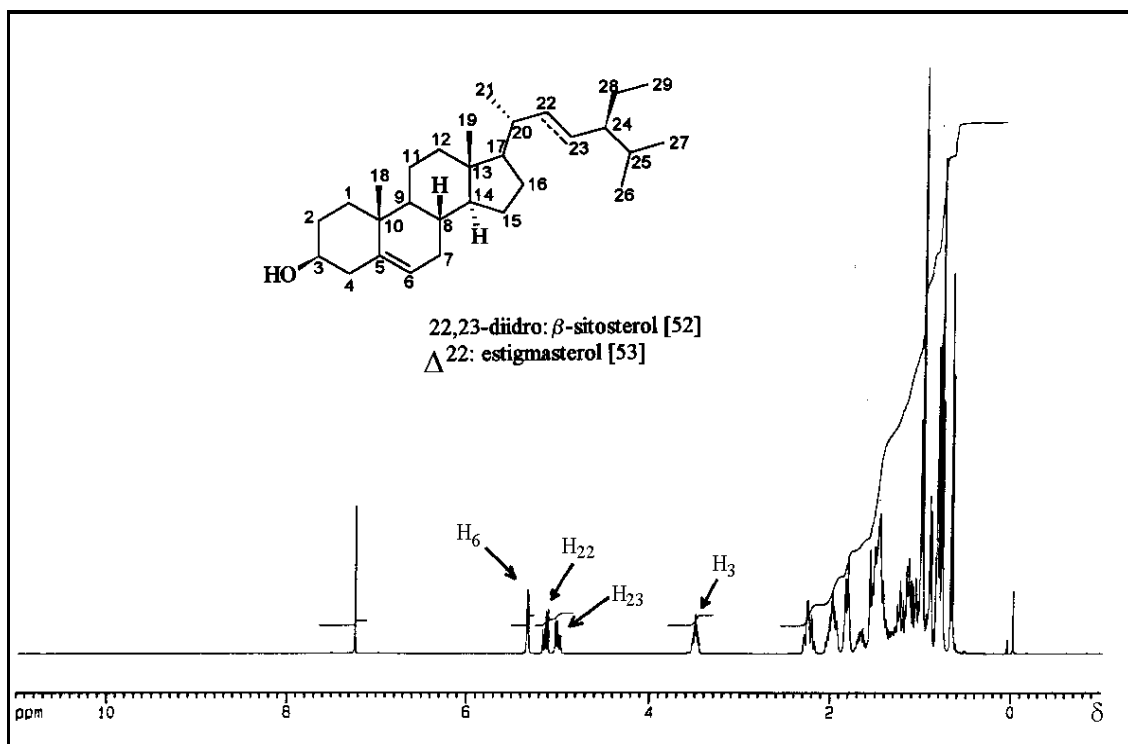


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração CP(3)59-110.

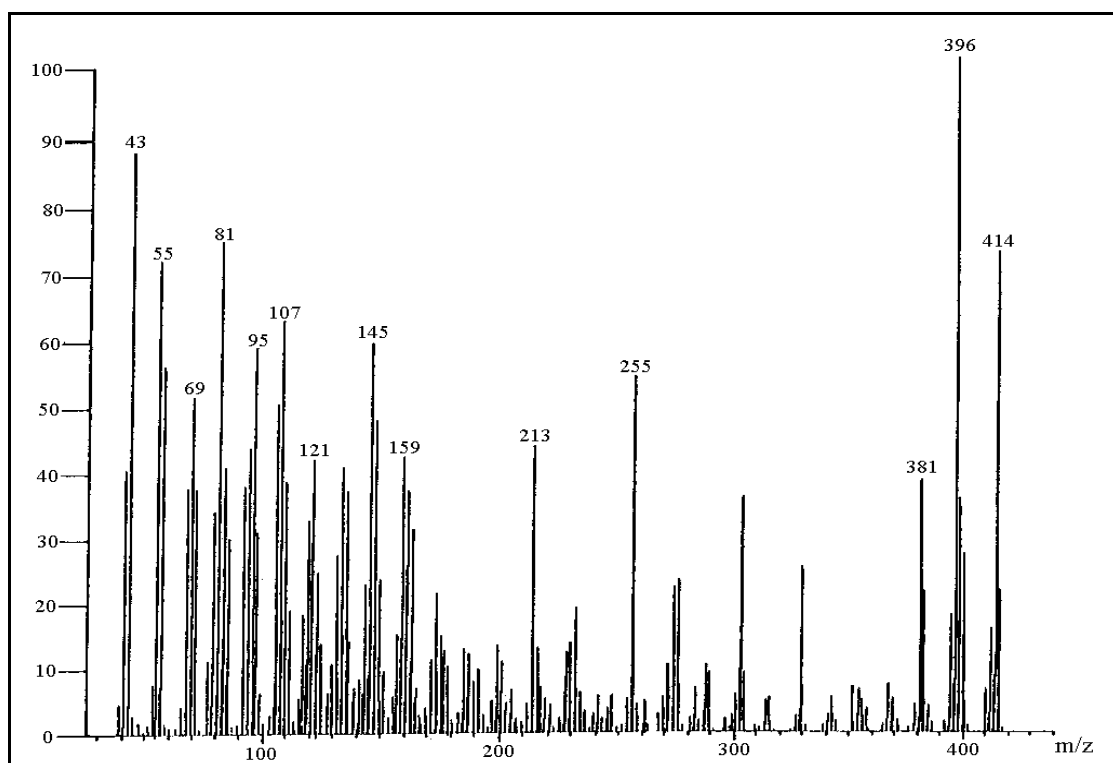
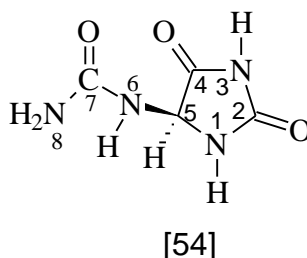


Figura 23 - Espectro de massas de CP(3)59-110.

3.2.4. Alantoína



A fração RPS₁ apresentou-se como um sólido branco cristalino insolúvel em clorofórmio, etanol e metanol, sendo apenas solúvel em água, a quente. O espectro no infravermelho (Figura 24) apresentou picos em 3.420, 3.320 cm⁻¹ (ν N-H, NH₂ do grupo uréia), 3.180, 3.060 cm⁻¹ (ν N-H do anel), 1.780, 1.710 cm⁻¹ (ν C=O do anel) e 1.650, 1.600 cm⁻¹ (ν C=O do grupo uréia). Os espectros obtidos para a fração RPS₁ e uma amostra autêntica de alantoína mostraram-se idênticos e condizentes com os dados obtidos da literatura (POUCHERT, 1981).

Pela análise do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 25), observou-se a presença de um simpleto alargado em δ 10,53, o que sugeriu uma vizinhança com grande poder de desblindagem, sendo esse sinal atribuído ao hidrogênio (H-3) do anel, vizinho a duas carbonilas. O simpleto em δ 5,79, integrado para dois hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios de NH₂ do grupo uréia (2 H-8). Os dupletos em δ 6,90 e δ 5,25, com J = 8,1 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-1, respectivamente. Finalmente, o simpleto em δ 8,05 foi atribuído a H-6 (Quadro 7).

No espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (Figura 26), a ocorrência de sinais de carbonos carbonílicos auxiliou na confirmação da estrutura, com a presença de sinal em δ 174,4 (C=O do anel - C-4), δ 158,7 (C=O do grupo uréia - C-7) e δ 157,6 (outra C=O do anel - C-2) e, ainda, de um sinal em δ 63,2 do único carbono não-carbonílico (C-5) (Quadro 8).

A determinação da temperatura de fusão dessa fração também auxiliou na confirmação de que se tratava da alantoína, já que o composto se decompõe à temperatura de 230 °C, compatível com a literatura, que registra sua decomposição entre 230 e 240 °C (POUCHERT, 1981).

A alantoína [54], uma amida cíclica não-aromática, é um produto do metabolismo da purina, sendo distribuída largamente em sistemas biológicos. É conhecida pela sua atividade cicatrizante, sendo usada topicamente para tratamento de feridas supuradas na pele (DICTIONARY, 1994).

Uma das maneiras de fixação de nitrogênio simbiótico por algumas plantas é na forma de alantoína, sendo esta preferível em relação às outras, devido à baixa relação C:N deste composto (1:1), o que é importante para a planta, pois, quanto menor for esta relação, menor será o gasto energético para a planta na fixação do N simbiótico (TAIZ e ZEIGER, 1991).

O isolamento da alantoína no extrato etanólico da raiz da mucuna-preta sugere que esta planta, que é considerada uma boa leguminosa fixadora de nitrogênio, utiliza a biossíntese da alantoína para a fixação de nitrogênio simbiótico, o que reduziria assim seu gasto energético nesse processo metabólico (TAIZ e ZEIGER, 1991).

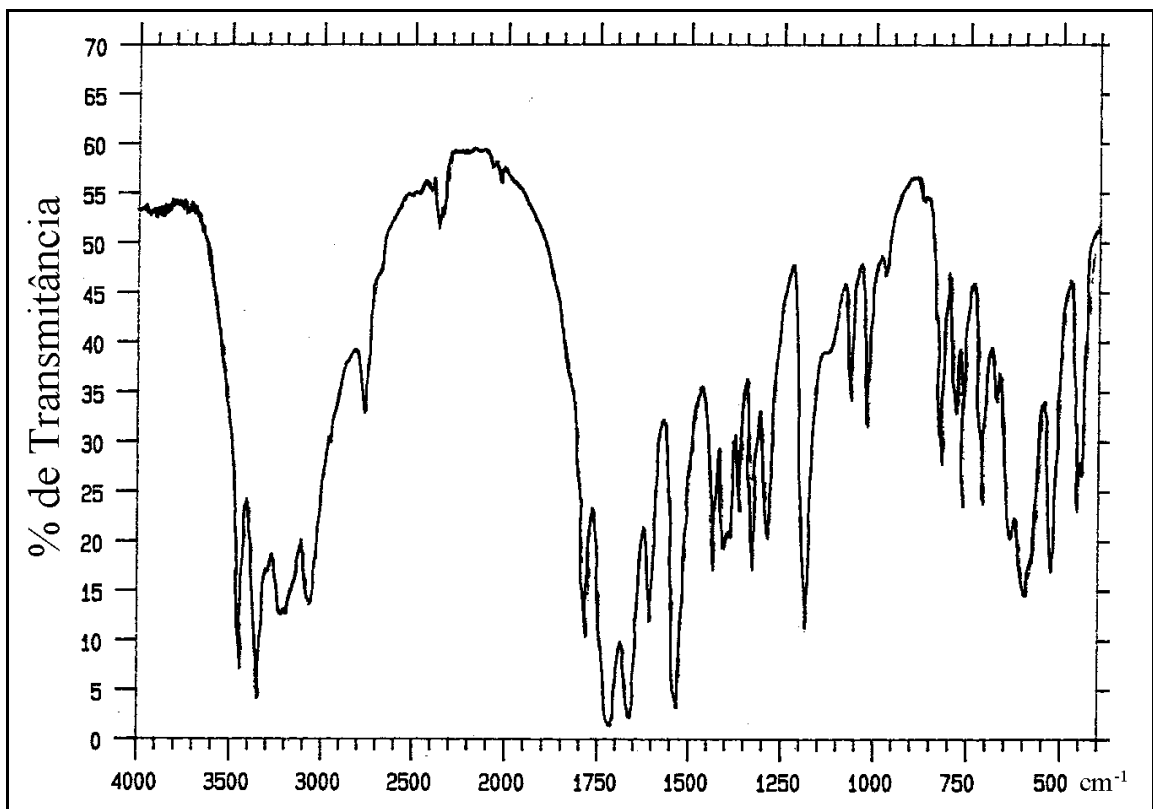


Figura 24 - Espectro no infravermelho da fração RPS₁.

Quadro 7 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) obtidos para RPS₁

H	RPS ₁ δ ^1H	Integração - Multiplicidade	J (Hz)
1	5,25	1H - d	8,1
3	10,53	1H - s	----
5	6,90	1H - d	8,1
6	8,05	1H - s	----
8	5,79	2H - s	----

Quadro 8 - Dados de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) obtidos para RPS₁ e comparação com valores de δ ^{13}C da literatura

C	RPS ₁ δ ^{13}C	Alantoína δ ^{13}C Lit. ¹
2	157,6	156,7
4	174,4	173,4
5	63,2	62,3
7	158,7	157,4

1 - Dados de RMN de ^{13}C (22,6 MHz, DMSO- d_6) obtidos da literatura (COXON et al., 1977).

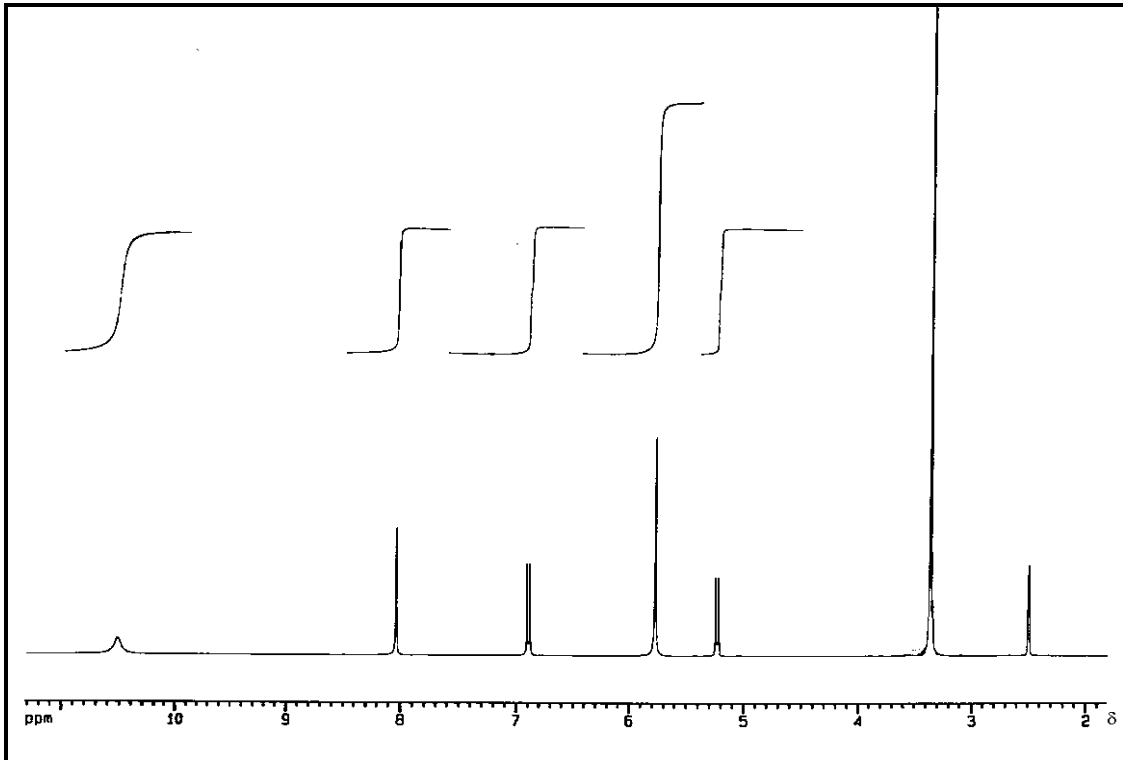


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) da fração RPS_1 .

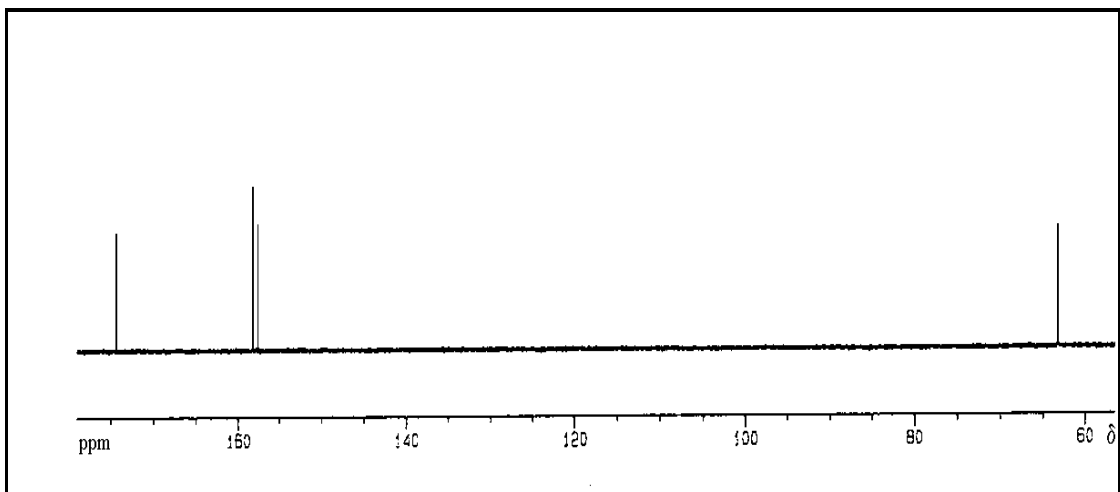


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da fração RPS_1 .

3.2.5. Álcool

A fração RPE(5)289-325 apresentou-se como um sólido branco amorfo (ponto de fusão: 75-77 °C), e seu espectro no infravermelho (Figura 27) foi característico de um álcool alifático, com uma banda de absorção entre 3.600 e 3.200 cm^{-1} (ν O-H) e absorções em 2.920 e 2.850 (ν C-H), 1.060 (ν C-O de álcool primário) e 720 cm^{-1} [δ_s (CH_2)_n; n > 4]. A análise do espectro de RMN de ^1H da fração RPE(5)289-325 (Figura 28), supostamente um álcool, foi dificultada devido à formação de um material gelatinoso durante a aquisição do espectro, onde foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado, o que impossibilitou a identificação do álcool.

Tal identificação seria importante, uma vez que um álcool alifático de cadeia longa (triacontan-1-ol [50]) já foi isolado da parte aérea da mucuna-preta e apresentou atividade nematicida diante de *Meloidogyne incognita* (NOGUEIRA et al., 1996), e este álcool não-identificado, isolado da raiz, também apresentou atividade nematicida, o que pode ser um indício de que compostos dessa natureza estejam envolvidos no mecanismo de ação da mucuna-preta quando na presença do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3.

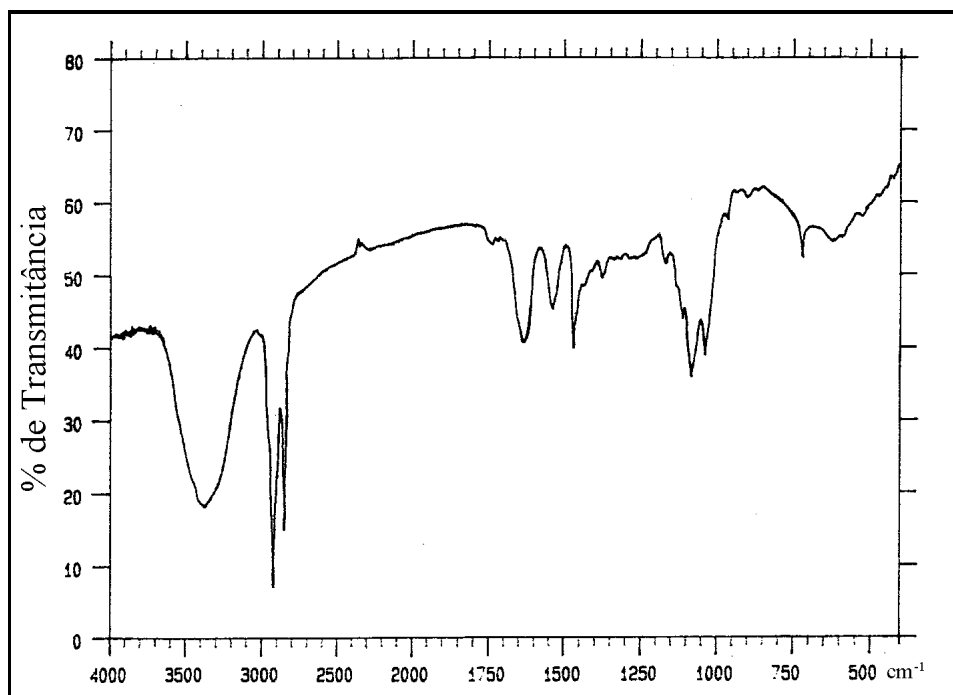


Figura 27 - Espectro no infravermelho da fração RPE(5)289-325.

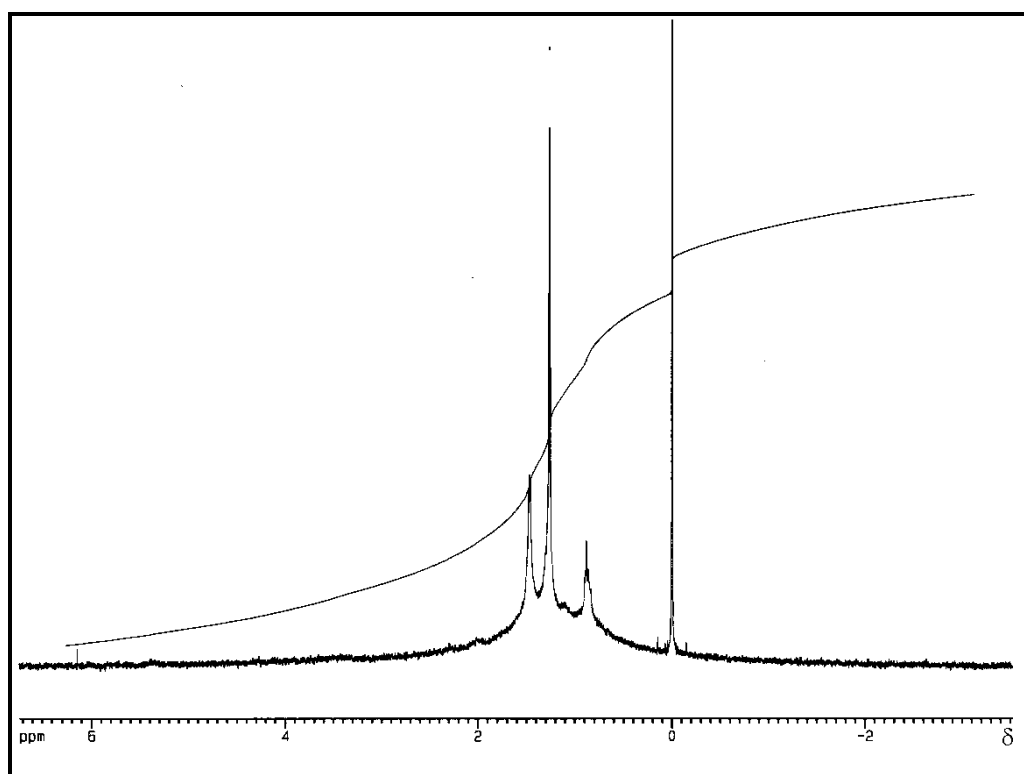
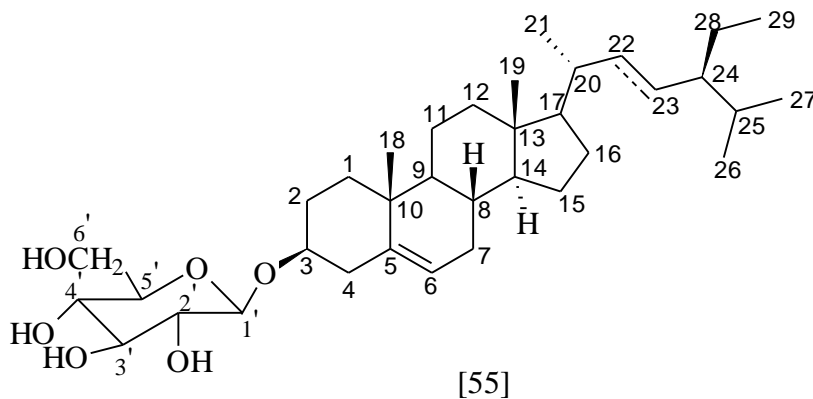


Figura 28 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da fração RPE(5)289-325.

3.2.6. Daucosterol



O espectro no infravermelho da fração RPB(1)160-191 (Figura 29) apresentou uma banda forte de absorção entre 3.600 e 3.150 cm^{-1} (ν O-H) e absorções em 2.970 , 2.930 e 2.850 (ν C-H), 1.450 , 1.370 e 1.360 (δ_s C-H e δ_s O-H) e 1.150 e 1.100 cm^{-1} . Apresentou também duas fortes absorções em 1.075 e 1.025 cm^{-1} (ν C-O) e bandas de absorção em 1.650 (ν C=C) e 800 cm^{-1} (δ_s C=C-H). O espectro dessa fração mostrou-se semelhante àquele obtido para a fração CP(3)59-110 (β -sitosterol + estigmasterol), sugerindo um composto derivado destes esteróides.

A comparação dos valores das absorções desse espectro com aqueles obtidos para a mistura de sitosterol-D(+)-glicosídeo e estigmasterol-D(+)-glicosídeo (MISRA e TIWARI, 1973) revela uma grande semelhança entre os dados.

O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (Figuras 30, 31, 32 e 33) indicou tratar-se de uma mistura de β -sitosterol glicosilado e estigmasterol glicosilado, ao serem comparados os sinais obtidos neste espectro aos valores encontrados na literatura (IRIBARREN e POMILIO, 1983) (Quadro 9).

Pelo espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 34) observou-se a presença de sinais de hidrogênios característicos de açúcares, como afirma AGRAWAL (1992), na região de δ 4,90 a δ 2,90, com três dupletos em δ 4,87, δ 4,85 e δ 4,84, relativos às hidroxilas de C-2', C-3' e C-4', um tripleto em δ 4,41 (OH do C-6', $J = 5,77$ Hz) e um dupletos em δ 4,22, com $J = 7,8$ Hz, característico de carbono anomérico de β -D-glicose.

Os sinais em δ 3,65 (ddd) e δ 3,46 (m) (2 H-6'), δ 3,40 (m de H-3'), δ 3,2 a δ 3,0 (sinais de H-5' e H-4') e, ainda, em δ 2,89 (ddd de H-2') reafirmam a presença do glicosídeo na estrutura.

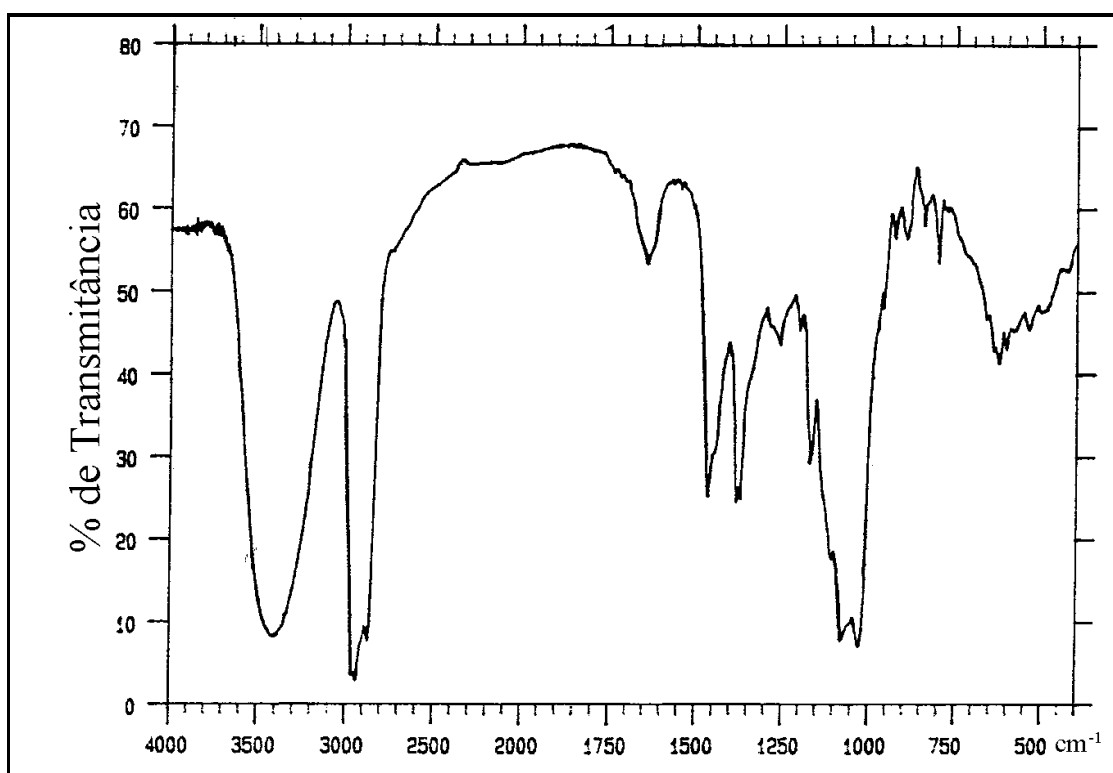


Figura 29 - Espectro no infravermelho da fração RPB(1)160-191.

Quadro 9 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da fração RPB(1)160-191 e comparação com valores de $\delta^{13}\text{C}$ da literatura

C	Sitosterol 3- <i>O</i> - β -glicosídeo (literatura) ¹ δ (25,2 MHz, Py- d_5)	RPB(1)160-191 δ (100 MHz, DMSO- d_6)
1	37,6	37,7
2	30,4	30,1
3	78,1	77,6
4	40,0	40,4
5	140,8	141,3
6	121,9	122,1
7	32,2	32,3
8	32,2	32,2
9	50,4	50,5
10	37,0	37,1
11	21,4	21,5
12	39,4	39,2
13	42,6	42,7
14	56,9	57,0
15	24,6	24,7
16	28,6	28,7
17	56,3	56,3
18	12,1 ^a	12,5
19	19,5	20,0
20	36,5	36,3
21	19,1 ^b	19,5
22	34,3	34,2
23	26,5	26,3
24	46,1	46,0
25	29,6	29,6
26	19,3 ^b	19,8
27	20,1	20,6
28	23,5	23,5
29	12,3 ^a	12,7
1(Gli)	102,6	101,7
2(Gli)	75,3	74,3
3(Gli)	78,5	77,7
4(Gli)	71,7	71,0
5(Gli)	78,6	77,8
6(Gli)	62,9	62,0

1 - IRIBARREN e POMILIO (1983).

a, b - sinais que podem ser interconvertidos.

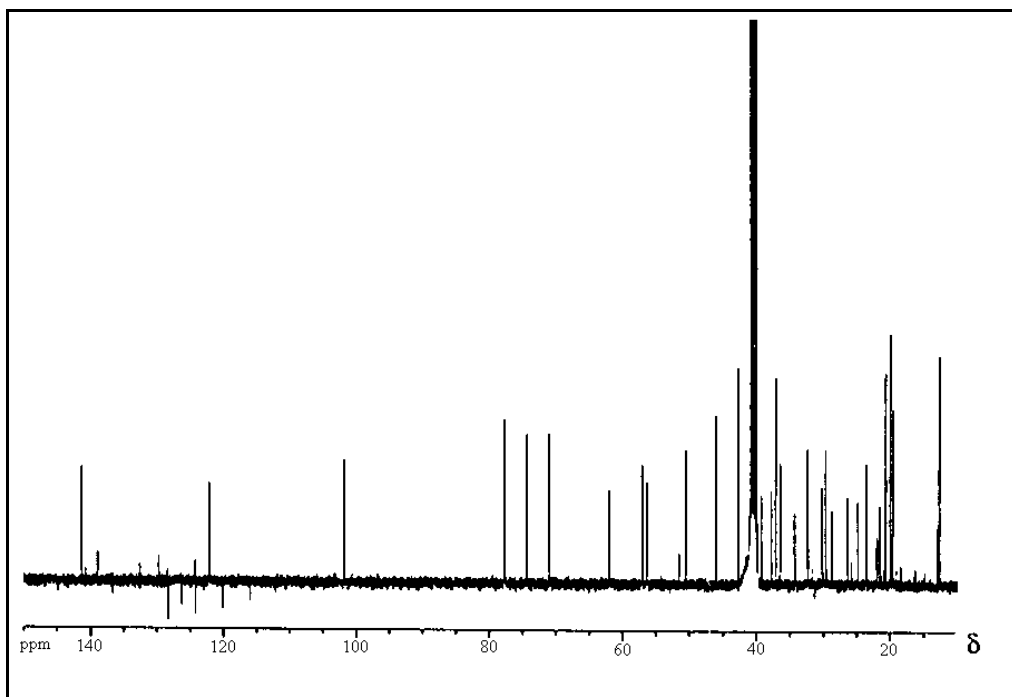


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da fração RPB(1)160-191.

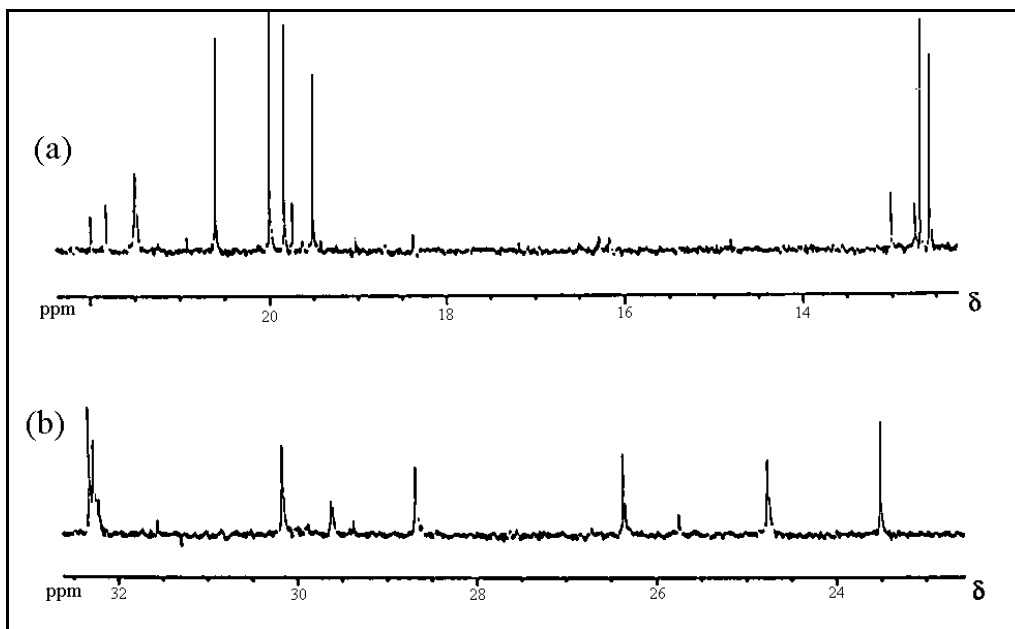


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da fração RPB(1)160-191, compreendendo a região de δ 13,0 a 21,0 (a) e δ 23,0 a 32,0 (b).

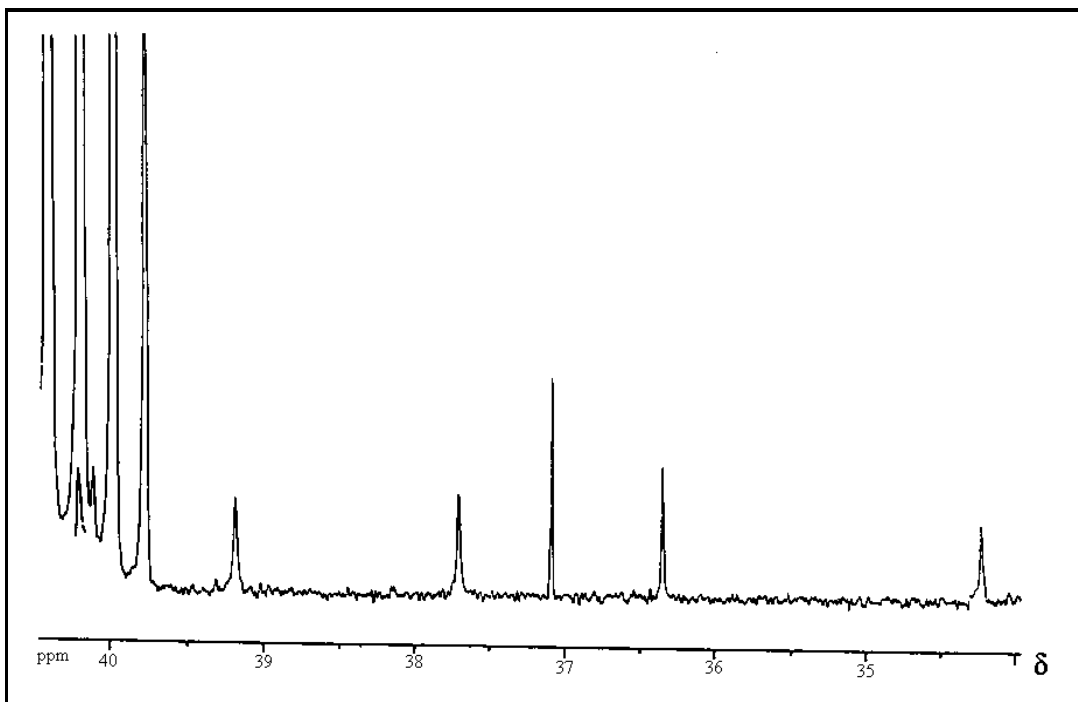


Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da fração RPB(1)160-191, compreendendo a região entre δ 34,0 e 40,0.

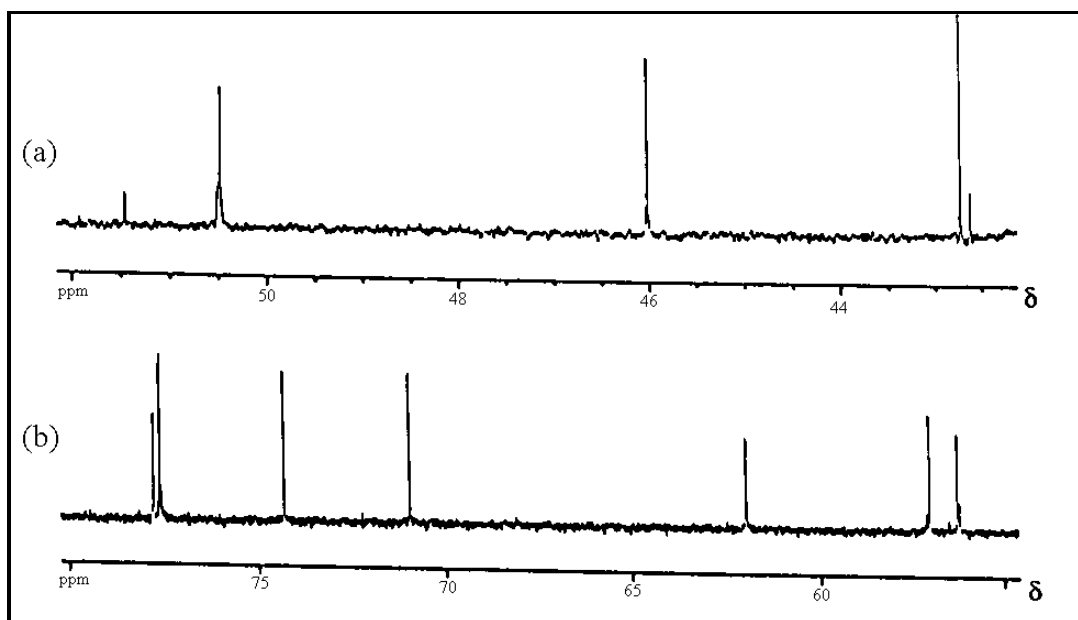


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da fração RPB(1)160-191, compreendendo a região de δ 43,0 a 51,0 (a) e δ 59,0 a 76,0 (b).

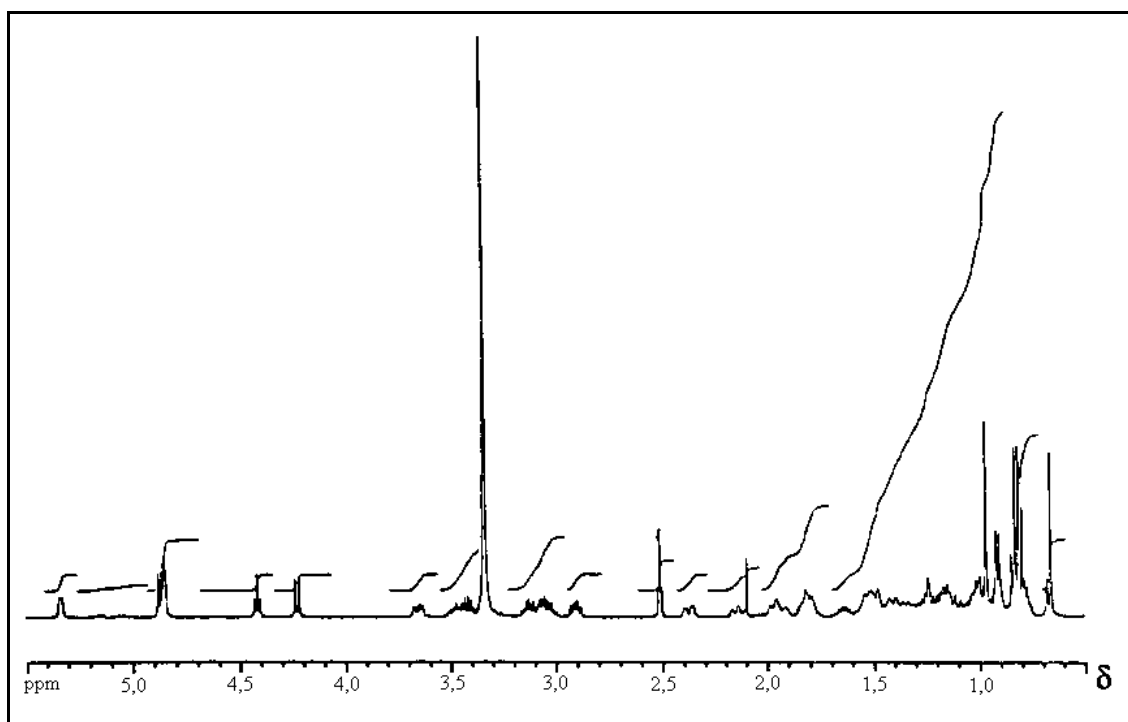


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) da fração RPB(1)160-191.

Para confirmação final da estrutura, fez-se a hidrólise da fração RPB(1)160-191. O material hidrolisado foi submetido à análise por CCD [solvente - Hex:EE (1:1)], apresentando um valor de R_f de 0,44, e este, por comparação e aplicação com um padrão de β -sitosterol e estigmasterol, mostrou tratar-se da mistura destes dois esteróides.

Para determinar a natureza do carboidrato presente na estrutura, fez-se uma análise por cromatografia gasosa com a fase aquosa obtida na hidrólise da fração RPB(1)160-191, após esta passar por um processo de redução e acetilação.

A análise dos resultados obtidos (Quadro 10 e Figura 35) permitiu identificar a glicose como o carboidrato presente na molécula, confirmando-se definitivamente a estrutura do daucosterol.

Quadro 10 - Tempos de retenção dos padrões de carboidratos (na forma de alditol acetato) e o tempo de retenção da fração RPB(1)160-191 hidrolisada (fase aquosa)

PADRÕES (forma de alditol acetato)	Tempo de retenção (minutos)	
	Padrões	RPB(1)160-191 hidrolisada (FA)
Ramnose	5,46	----
Arabinose	9,04	----
Xilose	12,92	----
Manose	18,88	----
Galactose	20,62	----
Glicose	23,40	23,43

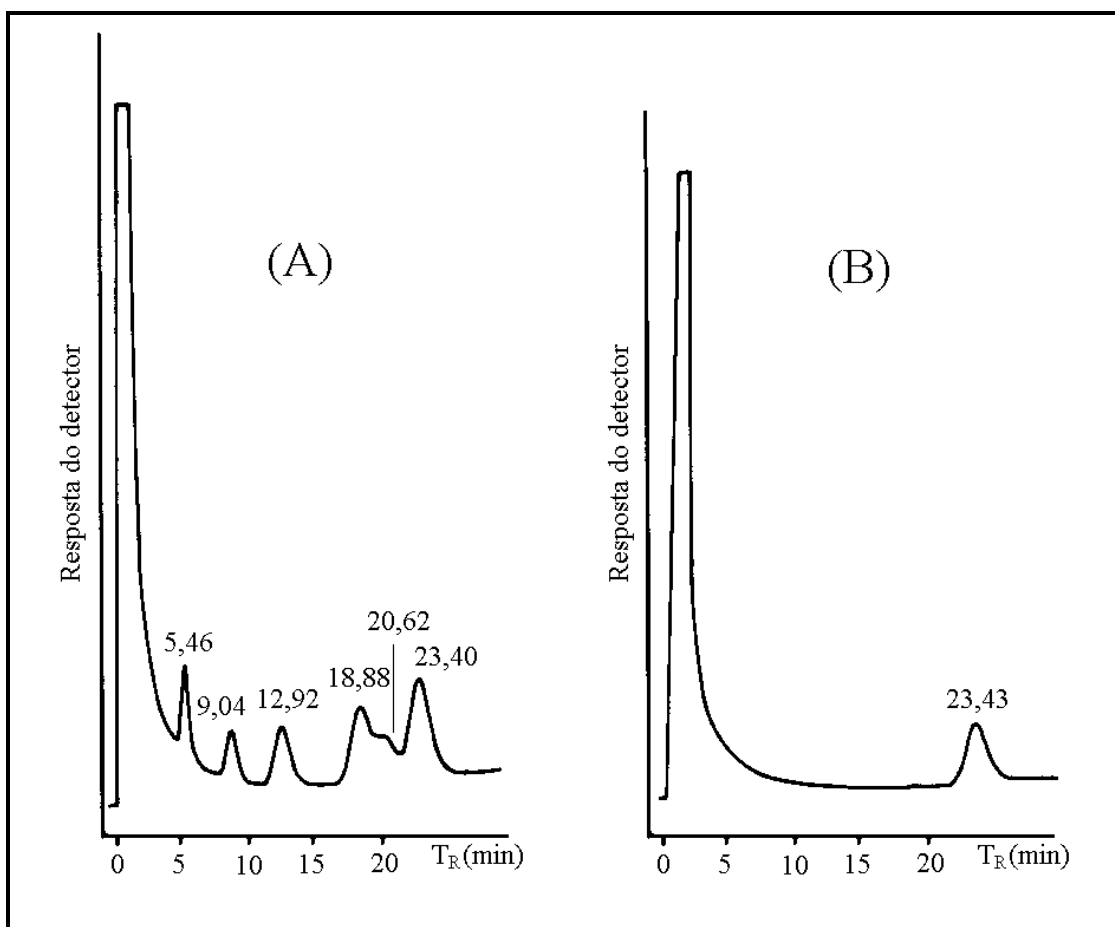


Figura 35 - Cromatograma dos padrões de açúcares (na forma de alditol acetato) (A) e da fração RPB(1)160-191 hidrolisada (fase aquosa) (B).

3.3. Análise de açúcares, por CCD, das frações RPE(1) E RPE(2)

A investigação da presença de açúcares no extrato etanólico da raiz da mucuna-preta [do qual resultou RPE(1) e RPE(2)] foi sugerida pela presença de formigas nos arredores do frasco, além da identificação de um cheiro adocicado do mesmo.

O resultado da análise qualitativa de RPE(1) e RPE(2) (Figura 36) revelou a presença de sacarose e glicose em ambas as amostras, através da comparação dos valores de R_f dos padrões utilizados e das amostras testadas na análise cromatográfica em camada delgada.

Esse resultado mostrou-se interessante porque, mesmo sem ter ocorrido o isolamento de carboidratos, não se procedendo assim à análise quantitativa dos açúcares em questão, foi possível verificar a sua presença no extrato etanólico da raiz utilizando-se uma metodologia relativamente simples, proposta por IKAN (1991).

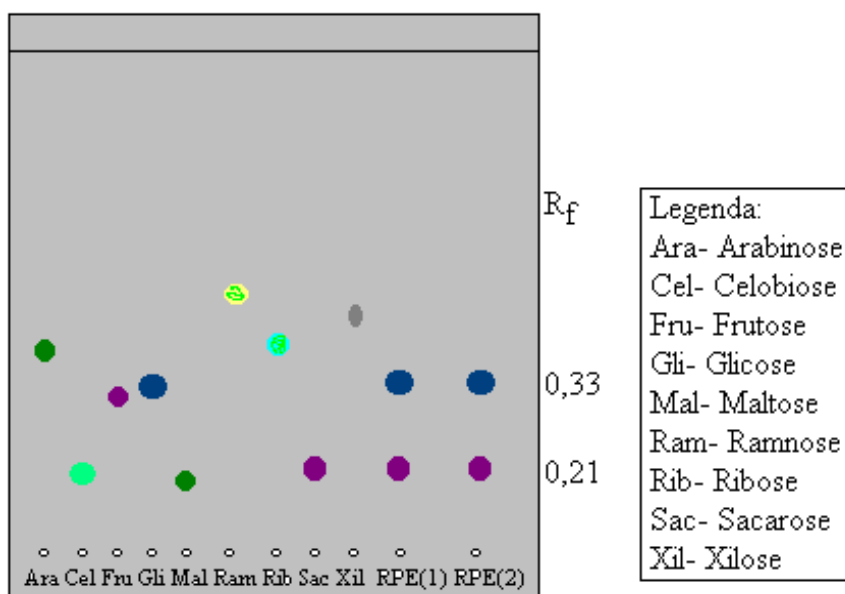


Figura 36 - Resultado da corrida cromatográfica para determinação dos carboidratos presentes no extrato etanólico (placa de sílica-gel).

3.4. Ensaio do tubo invertido - avaliação da atividade nematicida das amostras sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3

Neste ensaio buscou-se avaliar a atividade nematicida dos constituintes químicos da mucuna-preta sobre os juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3.

Preliminarmente, foram selecionados compostos-padrões (L-dopa, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linolênico, ácido caprílico, palmitato de metila e estearato de metila) para serem utilizados como parâmetros para os resultados dos ensaios biológicos. Estes compostos foram escolhidos baseando-se na ocorrência, no início dos fracionamentos dos extratos, de frações ricas em ácidos graxos e seus ésteres (caso da escolha dos ácidos-padrões e ésteres-padrões) e, no caso da L-dopa, na ocorrência em grande quantidade na semente e no potencial alelopático descritos na literatura (JANZEN et al, 1973; FUJII et al, 1991; BELL e NULU, 1971).

No primeiro teste, utilizando as amostras com uma concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se uma alta taxa de mortalidade para todas as amostras testadas, em relação ao branco (considerado como 0 % de mortalidade). Destas amostras, cinco apresentaram 100 % de mortalidade, e a menor porcentagem de mortalidade (48,3 %) foi apresentada pelo estearato de metila-padrão. A análise de variância confirmou o efeito significativo das amostras sobre os juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3, e, utilizando-se o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott, foram verificados cinco grupos distintos quanto à taxa de mortalidade (Quadros 11 e 12 e Figura 37).

Esses resultados, com altas taxas de mortalidade para todas as amostras testadas, sugeriram a possibilidade de a concentração utilizada no ensaio estar muito alta, o que levaria a um resultado inverossímil, já que poderia estar ocorrendo a morte dos nematóides devido à pressão osmótica do meio (meio hipertônico). Esse fato fez com que fosse realizado um segundo ensaio, utilizando-se amostras com uma concentração final menor.

Quadro 11 - Número de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne incognita* raça 3 recuperados ao final do ensaio do tubo invertido com amostras na concentração de 50 µg mL⁻¹, com inóculo inicial de 400 nematóides

Amostra	Número de Nematóides*		% de Mortalidade
Branco	355,83	A**	0
Estearato de metila (padrão)	184,00	B	48,3
Ác. linolênico (padrão)	172,83	B	51,4
Ác. esteárico (padrão)	77,17	C	78,3
Ác. caprílico (padrão)	38,17	D	89,3
Palmitato de metila (padrão)	33,00	D	90,7
CP(1)4-R (KNO ₃ + NaNO ₃)	10,00	E	97,2
CP(2)20-40 (mistura de ácidos graxos)	5,83	E	98,4
CP(2)1-19 (mistura de ésteres)	4,17	E	98,8
L-dopa (padrão)	1,50	E	99,6
Ác. palmítico (padrão)	0	E	100
RPS ₁ (alantoína)	0	E	100
RPS ₂ (KNO ₃ + NaNO ₃)	0	E	100
RPE(5)289-325 (álcool não-identificado)	0	E	100
CP(3)59-110 (β-sitosterol + estigmasterol)	0	E	100

* - Médias de seis repetições (duas contagens por repetição).

** - As médias seguidas pela mesma letra são iguais entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

Quadro 12 - Análise de variância do teste do tubo invertido ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Tratamento	14	882470,1	63033,58	64,09*
Resíduo	75	73761,0	983,48	

Coeficiente de variação: 53,30 %

* - Significativo, a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

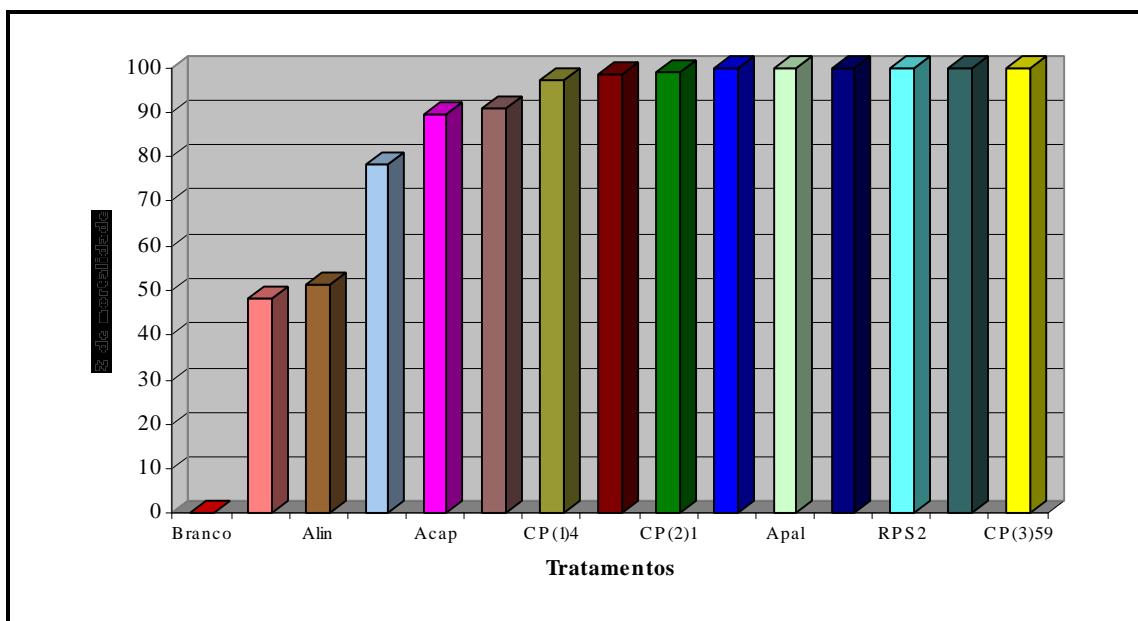


Figura 37 - Porcentagem de mortalidade apresentada pelos tratamentos sobre o número de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne incognita* raça 3, em relação ao branco, no ensaio do tubo invertido a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Nos resultados do segundo ensaio biológico, utilizando amostras com uma concentração final de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram observados novamente efeitos significativos sobre o número de juvenis vivos de *Meloidogyne incognita* raça 3 após o contato com as amostras, bem como uma diminuição nas taxas de mortalidade, fato este que demonstra a importância de concentrações adequadas em ensaios biológicos. Utilizando o teste de agrupamento de médias de Scott-Knott, verificaram-se quatro grupos distintos, quanto à taxa de mortalidade (Quadros 13 e 14 e Figura 38).

Nesse segundo ensaio, as amostras que apresentaram maior taxa de mortalidade foram CP(3)59-110 (β -sitosterol + estigmasterol) (74,4 %), álcool RPE(5) 289-325 (69,7 %), RPS₂ (KNO₃ + NaNO₃) (68,3 %), L-dopa (padrão) (64,4 %) e CP(1)4-R (KNO₃ + NaNO₃) (56,6 %). Por outro lado, as amostras que apresentaram menor taxa de mortalidade foram RPB(2)21-50 (mistura de ácidos graxos) (2,1 %), RPB(1)160-191 (β -sitosterol glicosilado + estigmasterol glicosilado) (6,0 %), ác. linolênico (padrão) (12,0 %) e RPS₁ (alantoína) (12,8 %). Esses resultados sugerem que parece não haver uma classe de substâncias exclusivamente responsável pela atividade nematicida apresentada pela mucuna-preta, já que substâncias distintas apresentaram a mesma atividade.

Um fato que deve ser destacado, mediante esses resultados, é a diferença na atividade nematicida das frações CP(3)59-110 (β -sitosterol + estigmasterol), com 74,4 % de atividade, e RPB(1)160-191 (β -sitosterol glicosilado + estigmasterol glicosilado), com apenas 6,0 % de mortalidade, o que demonstra que a presença de um grupo glicosil na molécula altera bastante a atividade biológica da substância. Este fato é interessante, visto que um dos principais processos de detoxificação de animais e plantas é exatamente a glicosilação da substância maléfica (HARBORNE, 1988).

Outro fato a ser observado seria com relação às substâncias que apresentaram maior atividade nesses ensaios biológicos. Com exceção do álcool RPE(5)289-325, as demais são produzidas em grande quantidade pela mucuna-preta, o que pode ser um indício de que esta leguminosa apresenta algum

mecanismo de ação diferenciado em relação a outras plantas utilizadas no combate aos fitonematóides.

A L-dopa (ensaiada utilizando um composto-padrão) também apresentou atividade nematicida. Essa substância, que é encontrada nas sementes das plantas do gênero *Mucuna* em grande quantidade (6-9 %), assim como nas folhas, de onde é carregada para o solo através do processo de lixiviação, aparece na literatura (JANZEN et al., 1973; FUJII et al., 1991; BELL e NULU, 1971) como estando envolvida no processo de atividade alelopática apresentado pela mucuna, porém não existia nenhum relato de sua atividade nematicida.

Fazendo uma correlação entre os dois ensaios biológicos realizados com as substâncias isoladas (50 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), observa-se que os três compostos que apresentaram maior atividade no primeiro ensaio foram os que também apresentaram maior atividade no segundo, sendo os resultados dos outros compostos também bastante coerentes, com exceção da fração RPS₁, que no primeiro ensaio apresentou 100 % de mortalidade e, no segundo, 12,8 %.

Quadro 13 - Número de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne incognita* raça 3 recuperados ao final do ensaio do tubo invertido com amostras na concentração de 5 µg mL⁻¹, com inóculo inicial de 400 nematóides

Amostra	Número de Nematóides*		% de Mortalidade
Branco	280,83	A**	0
RPB(2)21-50 (mistura de ácidos graxos)	275,00	A	2,1
RPB(1)160-191 (daucosterol + estigmasterol glic.)	264,00	A	6,0
Ác. linolênico (padrão)	247,00	A	12,0
RPS ₁ (alantoína)	244,83	A	12,8
CP(2)20-40 (mistura de ácidos graxos)	218,00	B	22,4
Estearato de metila (padrão)	199,67	B	28,9
Ác. palmítico (padrão)	192,67	B	31,4
Palmitato de metila (padrão)	177,50	C	36,8
Ác. caprílico (padrão)	170,33	C	39,3
Ác. esteárico (padrão)	160,83	C	42,7
CP(2)1-19 (mistura de ésteres)	157,50	C	43,9
CP(1)4-R (KNO ₃ + NaNO ₃)	121,83	D	56,6
L-dopa (padrão)	99,83	D	64,4
RPS ₂ (KNO ₃ + NaNO ₃)	89,00	D	68,3
RPE(5)289-325 (álcool não-identificado)	85,17	D	69,7
CP(3)59-110 (β-sitosterol + estigmasterol)	71,83	D	74,4

* - Médias de seis repetições (duas contagens por repetição).

** - As médias seguidas pela mesma letra são iguais entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

Quadro 14 - Análise de variância do teste do tubo invertido ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F
Tratamento	16	460132,8	28758,3	12,86*
Resíduo	85	190036,7	2235,73	

Coeficiente de variação: 26,30 %

* - Significativo, a 5 % de probabilidade, pelo teste F.

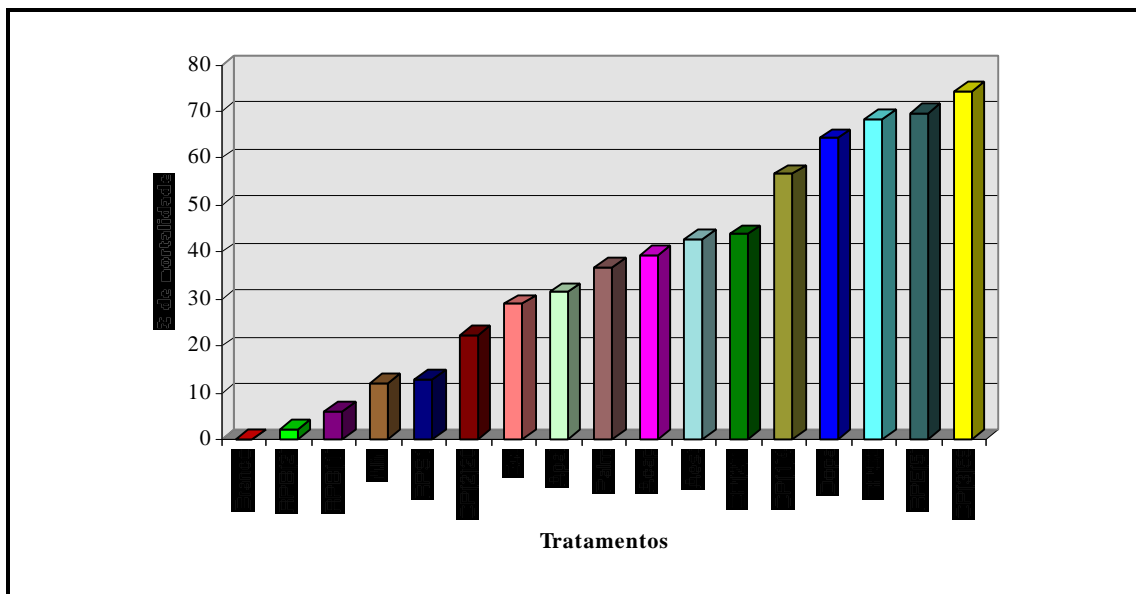


Figura 38 - Porcentagem de mortalidade apresentada pelos tratamentos sobre o número de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne incognita* raça 3, em relação ao branco, no ensaio do tubo invertido a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) tem sido largamente utilizada na agricultura, em sistemas de rotação de culturas, para vários fins, dentre os quais o controle de fitonematóides.

Em função dessa propriedade e do pouco conhecimento sobre os constituintes químicos responsáveis por essa atividade, este trabalho teve como objetivo comprovar a eficiência de mucuna-preta (*Mucuna aterrima*) no controle do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3 e identificar os compostos responsáveis pela atividade nematicida.

Preliminarmente, foram preparados os extratos etanólicos a quente e a frio da parte aérea (folha + caule) e da raiz da mucuna-preta. Estes extratos, na concentração de 1 % m/v, foram submetidos a ensaio biológico, para avaliação da inibição de eclosão de juvenis a partir de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3. Os resultados obtidos neste ensaio revelaram que todos os extratos inibiram a eclosão das massas de ovos, em uma faixa de 44 a 64 % de inibição, e o extrato da raiz obtido a frio mostrou-se mais eficiente.

De posse desses resultados, foram obtidos, em extrator soxhlet, os extratos etanólico do caule e etanólico e benzênico da raiz, sendo estes submetidos a fracionamentos sucessivos em colunas de sílica-gel. Estes fracionamentos levaram ao isolamento e à identificação de vários compostos. O

extrato obtido do caule resultou na identificação dos seguintes constituintes: $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (4,9 %, em massa deste extrato), ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos (6,2 %) e β -sitosterol + estigmasterol (0,5 %). Os extratos da raiz forneceram: $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (1,0 %), ácidos graxos (0,7 %), β -sitosterol + estigmasterol (2,8 %), alantoína (2,3 %), β -sitosterol glicosilado (daucosterol) + estigmasterol glicosilado (0,15 %) e, ainda, um álcool não-identificado (0,2 %).

As frações contendo ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos foram derivatizadas e analisadas por cromatografia em fase gasosa. Essa análise resultou na identificação dos ácidos palmítico, esteárico, oléico e linoléico e dos ésteres miristato, palmitato, estearato, oleato e linoleato de metila, no caule, e dos ácidos palmítico, esteárico, icosanóico, henicosanóico, docosanóico, tricosanóico e tetracosanóico, na raiz.

Os compostos puros e as frações obtidas foram submetidos a ensaios biológicos, para avaliação do efeito dos mesmos sobre a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3. Também foram submetidos a esse mesmo ensaio padrões de L-dopa, de ácidos graxos (ác. caprílico, palmítico, esteárico e linolênico) e de ésteres de ácidos graxos (palmitato e estearato de metila). A L-dopa foi selecionada, apesar de não ter sido isolada através da metodologia utilizada neste trabalho, uma vez que ela é encontrada em grande quantidade nas sementes e folhas de *Mucuna*. Já os ácidos e ésteres foram selecionados com vistas a avaliar a atividade nematicida de cada composto puro sobre o fitonematóide, já que estes compostos só foram isolados na forma de misturas.

Os resultados obtidos revelaram que todas as amostras apresentaram alguma atividade sobre os juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3, porém os compostos mais ativos, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram β -sitosterol + estigmasterol (74,4 % de mortalidade, em relação ao branco), álcool não-identificado (69,7 %), $\text{KNO}_3 + \text{NaNO}_3$ (68,3 %), L-dopa (64,4 %) e CP(1)4-R (56,6 %).

Esses resultados demonstram que são vários os constituintes químicos presentes na mucuna-preta responsáveis pela sua atividade nematicida.

Em uma época na qual se busca cada vez mais o aumento da produtividade agrícola e a não-agressão ao meio ambiente, o estudo de plantas como esta do gênero *Mucuna*, dotadas de grande potencial de utilização, deve merecer especial atenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v.31, n.10, p.3307-3330, 1992.
- BARBERÁ, C. **Pesticidas agrícolas**. 2. ed. Barcelona: Omega, 1974. 569p.
- BELL, E. A., JANZEN, D. H. Medical and ecological considerations of L-dopa and 5-HTP in seeds. **Nature**, v.229, p.136-137, 1971.
- BELL, E. A., NULU, J. R., CONE, C. L-dopa and L-3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a new imino acid, from seeds of *Mucuna mutisiana*. **Phytochemistry**, v.10, p.2191-2194, 1971.
- BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919p.
- BEZERRA, M. Z. B., CAMPELO, P. .A., MACHADO, M. I. L. et al. Constituintes químicos isolados de três espécies do gênero *Sclerobium*. **Química nova**, v.17, n.5, p.405-445, 1994.
- BUCKLES, D. Velvetbean: a “new” plant with a history. **Economic Botany**, v.49, p.13-25, 1995.

CASEY, M., LEONARD, J., LYGO, B., et al. **Advanced practical organic chemistry**. 1. ed. New York: Chapman & Hall, 1990. 264p.

CHITWOOD, D. J. Naturally occurring nematocides. In: DUKE, S. O., MENN, J. J., PLIMMER, J. R. (Eds.). **Pest control with enhanced environmental safety**. Washington: American Chemical Society, 1993. p.300-315. (American Chemical Society Symposium Series, 524).

COXON, B., FATIADI, A. J., SNIEGOSKI, L. T. et al. A novel acylative degradation of uric acid. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of uric acid and its degradation products. **Journal organic chemistry**, v.42, n.19, p.3132-3140, 1977.

DIAS, W. P., FERRAZ, S., LIMA, R. D. Efeito de algumas espécies vegetais sobre a população de *Heterodera glycines* Ichinohe, em casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, v.20, p.370, 1995.

DICTIONARY of natural products. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1994. v.1.

DING, Y., KINJO, J., YANG, C. R., NOHARA, T. Triterpenes from *Mucuna birdwoodiana*. **Phytochemistry**, v.30, n.11, p.3703-3707, 1991.

ENGLYST, H. N., CUMMINGS, J. H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, v.109, p.937-942, 1984.

FERRAZ, C. A. M., CIA, E., SABINO, N. P. Efeito da mucuna e amendoim em rotação com algodoeiro. **Bragantia**, v.36, n.1, p.1-9, 1977.

FUJII, Y., SHIBUYA, T., YASUDA, T. Allelopathy of velvetbean: its discrimination and identification of L-dopa as a candidate of allelopathic substances. **Japan agricultural research quarterly**, v.25, p.238-247, 1992.

FUJII, Y., SHIBUYA, T., YASUDA, T. L-3,4-dihydroxyphenilalanine as an allelochemical candidate from *Mucuna pruriens* (L.) DC. var. *utilis*. **Agricultural and biological chemistry**, v.55, n.2, p.617-618, 1991.

- GODA, Y., SHIBUYA, M., SANKAWA, U. Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Mucuna birdwoodiana*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v.35, n.7, p. 2675-2677, 1987.
- HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3. ed. London: Academic, 1988. 356p.
- HASAN, S. Q., SHERWANI, M. R. K., AHMAD, F. et al. Epoxy acids of *Mucuna prurita* seed oil. **Journal of the indian chemistry society**, v.57, p.920-922, 1980.
- HATTORI, S., KOMAMINE, A. Stizolobic acid: a new aminoacid in *Stizolobium hassjoo*. **Nature**, v.183, p.1116-1117, 1959.
- IKAN, R. **Natural products: a laboratory guide**. 2. ed. San Diego: Academic, 1991. 360p.
- IRIBARREN, A. M., POMILIO, A. B. Components of *Bauhinia candicans*. **Journal of natural products**, v.46, n.5, p.752-753, 1983.
- ISHIKURA, N., YOSHITAMA, K. C-glycosylflavones of *Mucuna sempervirens*. **Phytochemistry**, v.27, n.5, p.1555-1556, 1988.
- JAEHN, A. Efeito da temperatura no desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* raça 2 em mucuna preta. **Nematologia brasileira**, v.17, n.1, p.57-65, 1993.
- JANZEN, D. H., REHR, S. S., FEENY, P. P. L-dopa in legume seeds: a chemical barrier to insect attack. **Science**, v.181, p.81-82, 1973.
- LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314p.
- McSORLEY, R., DICKSON, D. W., BRITO, J. A. et al. Effects of tropical rotation crops on *Meloidogyne arenaria* population densities and vegetable yields in microplots. **Journal of nematology**, v.26, n.2, 175-181, 1994.

- MISRA, A. N., TIWARI, H. P. Mass spectral studies of phytosterolins and a ketone from *Trianthema pentandra*. **Phytochemistry**, v.12, p.393-395, 1973.
- MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. 1996. v.4, p.209-244.
- NIRAJAN, G. S., KATIYAR, S. K. Chemical composition of some legumes. **Journal of the indian chemistry society**, v.56, p.822-823, 1979.
- NOGUEIRA, M. A. **Estudo químico de *Mucuna aterrima* e da sua atividade nematicida sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3**. Viçosa, MG:UFV, 1994. 101p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- NOGUEIRA, M. A., OLIVEIRA, J. S., FERRAZ, S. Nematicidal hydrocarbons from *Mucuna aterrima*. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.997-998, 1996.
- PAULA, V. F. **Estudo químico e da interação inseto-planta em *Ochroma lagopus* Swartz**. Viçosa, MG:UFV, 1995. 134p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- PLOUVIER, V. Nouvelles recherches de cyclitols dans quelques groupes botaniques: le L-inositol de composées, le D-pinitol des légumineuses. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'academie des sciences**, v.255, p.1770-1772, 1962.
- POUCHERT, C. J. **The aldrich library of infrared spectra**. 3. ed. Wisconsin:Aldrich chemical company, 1981. p. 479.
- POUCHERT, C. J. **The aldrich library of NMR spectra**. 2. ed. Wisconsin: Aldrich chemical company, v.1, 1983. p. 677.
- RESENDE, I. C. **Reação varietal do quiabeiro a *Meloidogyne* spp. e avaliação do controle por rotação com mucuna e tratamento químico de sementes**. Viçosa, MG:UFV, 1986. 45p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1986.

- RODRIGUEZ-KÁBANA, R., CANULLO, G. H. Cropping systems for the management of phytonematodes. **Phytoparasitica**, v.20, p.211-224, 1992a.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R., PINOCHET, J., ROBERTSON, D. G. et al. Crop rotation studies with velvetbean (*Mucuna deeringiana*) for the management of *Meloidogyne* spp. **Journal of nematology**, v.24, n.4, p.662-668, 1992b.
- SANTOS, M. A., RUANO, O. Reação de plantas usadas como adubos verdes a *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. javanica*. **Nematologia brasileira**, v.11, p.184-197, 1987.
- SHINOZAKI, H., ISHIDA, M. Stizolobic acid, a competitive antagonist of the quisqualate - type receptor at the crayfish neuromuscular junction. **Brain Research**, v.451, 353-356, 1988.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 1991. 419p.
- SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 6. Ed. New York:Saunders Golden Sunburst, 1991. 892p.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. 1. ed. Redwood: Benjamin/Cummings, 1991. 564p.
- TENENTE, R. C. V. **Influência da mucuna preta (*Stizolobium aterrimum* PIPER & TRACY) no ciclo vital de *Meloidogyne incognita* (KOFROID & WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949**. Piracicaba, SP:ESALQ, 1980. 46p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1980.
- TENENTE, R. C. V., LORDELLO, L. G. E. Penetração e crescimento de *Meloidogyne incognita*, raça 4, em raízes de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*). **Nematologia brasileira**, v.11, p.242-248, 1987.

- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 1993. 372p.
- TSAI, B. Y., WEST, J., VAN GUNDY, S. D. et al. Screening plants for nematicidal agents. In: KUBU, I., JACOBSON, M. (Eds.). **Phytochemical pesticides**. Oxford: CRC Press, 1991. v.11, p.1-26.
- VALLE, L. A. C. **Controle do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, com leguminosas e gramíneas forrageiras**. Viçosa, MG:UFV, 1996. 74p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- VICENTE, N. E., ACOSTA, N. Effects of *Mucuna deeringiana* on *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, v.17, n.1, p.99-102, 1987.
- VIEIRA, C. **Efeito da adubação verde intercalar sobre o rendimento do milho**. Viçosa, MG:UREMG, 1960. 57p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1960.
- VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**. 1. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. 665p.
- WEAVER, D. B., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., CARDEN, E. L. Velvetbean in rotation with soybean for management of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria*. **Journal of nematology**, v.25, n.4, p.809-813, 1993.
- WEAVER, D. B., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., ROBERTSON, D. G. et al. Velvetbean for the management of root-knot in peanut. **Journal of nematology**, v.26, n.1, p.124, 1994.
- WUTKE, E. B. Adubação verde: manejo da fitomassae e espécies utilizadas no estado de São Paulo. In: WUTKE, E. B., BULISANI, E. A., MASCARENHAS, H. A. A. (Eds.). **Curso sobre adubação verde no Instituto Agrônomo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1993. p.17-29.

YOSHIDA, T. A new amine, stizolamine, from *Stizolobium hassjoo*. **Phytochemistry**, v.15, p.1723-1725, 1976.

YOSHIDA, T., AKINO, M. Occurrence of unconjugated pterins in a higher plant. *Stizolobium hassjoo*. **Experientia**, v.36, p.639-640, 1980.