



Efeito de Constituintes Químicos Isolados da Casca do Fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a Eclosão de Juvenis de *Meloidogyne incognita* Raça 3

Marcelo H. DOS SANTOS ^{1*}, Rodrigo S. CORRÊA ², Miguel D. ROCHA ²,
Tanus J. NAGEM ³, Tânia T. OLIVEIRA ⁴, Rosângela D. LIMA ⁵ & José R. OLIVEIRA ⁵

¹ Depto. de Farmácia, ² Depto. de Ciências Exatas, Univ. Federal de Alfenas,
Unifal-MG. Rua Gabriel Monteiro da Silva, nº 714, Centro, 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

³ Univ. Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, MG, Brasil.

⁴ Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular,

⁵ Depto. de Fitopatologia, Univ. Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil

RESUMO. Os constituintes químicos isolados do fruto (pericarpo) de *Rheedia gardneriana* ("bacupari"), foram identificados como 7-epiclusianona (I), o ácido oleanólico (II) e uma mistura de sesquiterpenos (III) e testados, *in vitro*, quanto à sua atividade biológica sobre a eclosão de juvenis do nematóide *Meloidogyne incognita* raça 3 na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Os resultados mostraram que o ácido oleanólico foi o mais eficiente, com uma taxa de inibição de eclosão de juvenis de 40,46%, caracterizada como um efeito nematostático, uma vez que a eclosão de juvenis ocorreu quando os ovos tratados pela substância foram transferidos para a água.

SUMMARY. "Effect of the Chemical Constituents isolated from the Fruit of *Rheedia gardneriana* on Juveniles Hatch of *Meloidogyne incognita* race 3". The chemical constituents isolated from the fruit (pericarp) of *Rheedia gardneriana* (bacupari) and identified as 7-epiclusianone (I), oleanolic acid (II), and a mixture of sesquiterpenes (III) were tested to biological activity "*in vitro*" on juveniles hatch of *Meloidogyne incognita* race 3 shown nematode effect in 100 µg.mL⁻¹ concentration. The results evidenced that oleanolic acid was most efficient because it showed highest inhibition levels of the juveniles hatch (40.46%), identified as nematostatic effect by the fact of the juveniles hatch had been occurred after translating the eggs for water.

INTRODUÇÃO

No controle de fitonematóides, a utilização de produtos sintéticos tem trazido inúmeros problemas pelo acúmulo de resíduos tóxicos em água e solos e, sendo persistentes no meio resulta em poluição ambiental e conseqüentemente trazendo prejuízos à saúde humana ^{1,2}. A busca de constituintes químicos biodegradáveis no solo tem sido alvo de diversas pesquisas que visam o manejo de áreas infestadas pelos nematóides parasitas de plantas por métodos alternativos de controle. O uso de plantas antagonistas é um método de controle eficiente e que não oferece riscos ao ambiente.

A aplicação de extratos de plantas ou incorporação de folhas ao solo não é viável na maioria dos casos, pois a quantidade requerida para se obter uma alta eficiência é muito grande ³. Alguns extratos e óleos vegetais, entretanto, são eficientes quando empregados em tratamento de sementes ou imersão de raízes, o que torna

viável o seu uso direto, principalmente, em pequenas propriedades. Torna-se necessária a busca de compostos contra os nematóides que possam servir de base para o desenvolvimento de novas formulações, menos danosos ao homem e ao ambiente ⁴. Neste sentido são testados extratos que podem conduzir ao isolamento de princípios ativos.

Foi realizada uma avaliação "*in vitro*" por Scramin *et al.* ⁵ sobre a atividade nematocida ou nematostática contra juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* raça 1, com cerca de 60 extratos (a 1%), de diferentes espécies e partes vegetais, obtidos por extração com solventes orgânicos [hexano(H), clorofórmio(C) e etanol (E)]. Destes, dez plantas mostraram atividade em potencial: *Tagetes minuta* (folha-H e caule-H), *Tagetes patula* (caule-C), *Cassia occidentalis* (fruto-E), *Argeratum conyzoides* (folha-C), *Vernonia condensata* (caule-H,C) e *Alomia fastigiata* (flor-H). Sukul ⁷ estudou plantas com atividade

PALAVRAS CHAVE: *Meloidogyne incognita*, Nematostático, *Rheedia gardneriana*.

KEY WORDS: *Meloidogyne incognita*, Nematostatic, *Rheedia gardneriana*.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: marcelo_hs@yahoo.com.br

nematicida de 57 famílias de Compositae e de 12 espécies de Euphorbiaceae. Observou que o monoterpênóide eugenol, extraído de *Ocimum sanctum* L., mostrou marcante ação nematicida sobre *Meloidogyne incognita*.

Giebel⁶ testou extratos etanólicos das raízes de 21 espécies de Solanaceae, notando que os extratos hidrolisados tinham maior atividade sobre *Heterodera rostochiensis*. Por outro lado Babu & Sukul⁸ testaram extratos aquosos e óleos essenciais contendo limoneno e mentol de folhas de *Hyptis suaveolens* sobre *Meloidogyne incognita*, e verificaram sua ação nematicida. Resultados positivos foram também obtidos para citral, geraniol, farnesol, fitol, ácido abiético e 2-metoxixantona, esta última isolada de *Mesua ferrea* Linn. (Guttiferae)¹.

O estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana*⁹⁻¹³, levou ao isolamento, purificação e identificações por meio de métodos espectrométricos (UV, IV, RMN de ¹H e de ¹³C, massas) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, de três constituintes: 7-epiclusianona (I), ácido oleanólico (II), e uma mistura de sesquiterpenos (III). A mistura de sesquiterpenos (III) apresentou quatro constituintes que foram identificados como α -copaeno (III-a); α -muuroloeno (III-b); (1S,10S,6R)-10-isopropyl-3-methyl-7-methylenebicyclo[4.4.0]dec-2-ene (III-c); cadineno (III-d) (Fig. 1). Como já fora identificado o efeito nematicida de terpenóides isolados de plantas^{1,7}, buscou-se avaliar se tais substâncias obtidas de *R. gardneriana* apresentam atividade nematicida, como inibidores

de eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3 que foram avaliadas, *in vitro*, visando o controle de *Meloidogyne incognita* raça 3.

MATERIAL E MÉTODOS

As massas de ovos foram obtidas a partir de culturas puras de *Meloidogyne incognita* raça 3, mantidas em casa de vegetação, em plantas de tomateiro cv. Santa Cruz (*Lycopersicon esculentum* Mill). As plantas foram removidas dos vasos, e os sistemas radiculares lavados delicadamente, para não perder as massas de ovos. Sob um microscópio estereoscópico e com a ajuda de uma pinça e um estilete, as massas de ovos foram retiradas individualmente e transferidas para câmaras de eclosão.

7-Epiclusianona (I), ácido oleanólico (II) e a mistura de sesquiterpenos (III), isolados de *Rheedia gardneriana*, foram testadas sobre os nematóides, usando-se suspensões na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estes constituintes foram suspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% em água destilada, utilizando-se aparelho de ultra-som. Adicionaram-se 3,0 mL de cada suspensão à câmara de eclosão, constituída de placa de Petri (5,0 cm de diâmetro), contendo tela de nylon com malha de 1 mm forrada com papel permeável¹⁴. Neste conjunto, foram depositadas dez massas de ovos/placa. Utilizaram-se cinco placas (repetições) por tratamento. Duas testemunhas foram mantidas: uma, onde se empregou somente água destilada (3,0 mL) e outra, onde se empregou somente a suspensão em DMSO a 1% (3,0 mL). As câmaras de eclosão foram mantidas à temperatura ambiente (20-28 °C) e em ausência de luz.

As avaliações foram realizadas 48, 96, 144, 192 e 240 h após a montagem das placas e, consistiu da contagem do número de juvenis de segundo estágio eclodidos (J₂) sob microscópio estereoscópico. A cada avaliação, as telas juntamente com as massas de ovos eram transportadas para placas de Petri as respectivas suspensões recém preparadas.

Posteriormente, escolheu-se a substância II (ácido oleanólico), a qual apresentou a maior atividade de inibição de eclosão dos juvenis para estudar o efeito de dosagem sobre a eclosão de J₂ de *M. incognita* raça 3. Utilizaram-se suspensões, nas concentrações de 800, 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em DMSO a 1%, repetindo-se o procedimento anterior. Ao final das 5 avaliações ou das 240 h retiraram-se as respectivas suspensões, substituindo-as por água destilada visando avaliar o caráter nematicida ou nematostático dessa substância. Procedeu-se à ava-

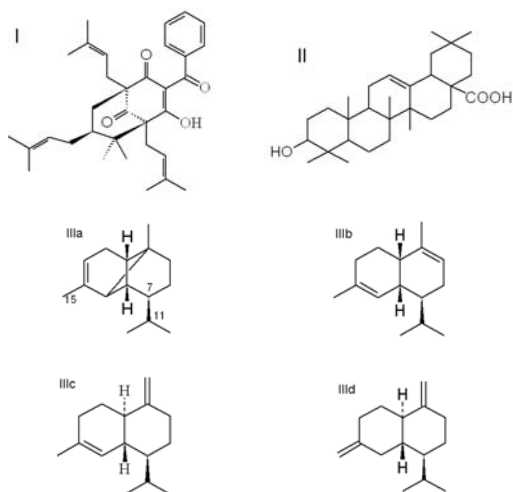


Figura 1. Estrutura dos constituintes químicos isolados dos frutos de *Rheedia gardneriana*. (I) epi-clusianona, (II) ácido oleanólico e (III) mistura de sesquiterpenos: (III-a) α -copaeno; (III-b) α -muuroloeno; (III-c) (1S,10S,6R)-10-isopropyl-3-methyl-7-methylenebicyclo[4.4.0]dec-2-ene; (III-d) cadineno.

liação (no de J₂ eclodidos) às 288 e 336 h após a implantação do teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de solvente água/DMSO a 1% usado para o preparo das suspensões mostrou o mesmo comportamento quanto à eclosão dos J₂ que a água pura (Fig. 2).

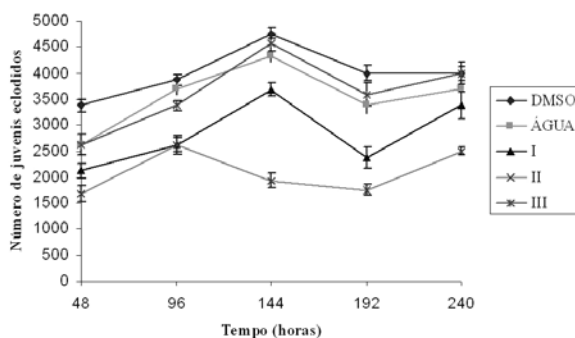


Figura 2. Efeito de constituintes químicos extraídos da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a eclosão *in vitro* de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* raça 3. (DMSO = Dimetilsulfóxido; I = 7-Epiclusianona; II = Ácido oleanólico; III = Mistura de sesquiterpenos).

Das três substâncias avaliadas, o ácido oleanólico apresentou maior porcentagem de inibição de eclosão de juvenis de *M. incognita* raça 3 em relação à água (Fig. 3). Apresentando uma taxa de inibição de eclosão de 40,46%, que foi caracterizada como um efeito nematostático, uma vez que a eclosão de juvenis ocorreu quando os ovos tratados pela substância foram transferidos para a água. Não foi encontrado, na literatura, relato sobre qualquer atividade do ácido oleanólico sobre a eclosão de juvenis de *M. incognita*. O valor negativo referente a substân-

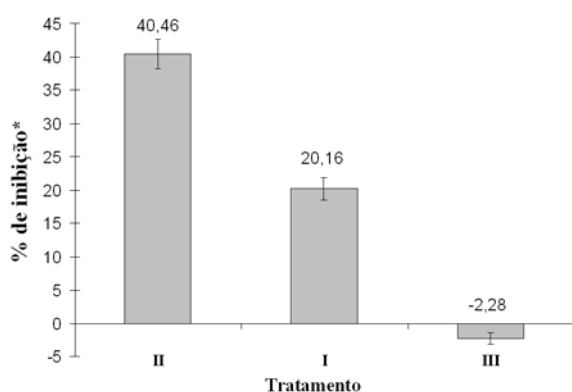


Figura 3. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre *Meloidogyne incognita*, raça 3, na concentração de 100 µg.mL⁻¹ ao final de 240 horas. (*A porcentagem é dada em relação ao número total de juvenis eclodidos na água).

cias III indicou um ligeiro estímulo à eclosão dos juvenis. Trata-se de uma mistura de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e, dos compostos similares descritos na literatura, somente os possuidores de oxigênio (cital, geraniol, farnesol, etc...) demonstraram ação sobre fitonematóides^{8,15}. Já I (7-http://www.xvicongresosilae.com.ar/trabajo_asignacion_arbitro.php?id=192&codigo=S7DTB55K36X9epiclusianona) demonstrou valor de inibição intermediário. Ela pertence à classe das benzofenonas preniladas, e a presença de uma carbonila ligada ao sistema aromático, têm permitido relacioná-la à resistência de certas plantas a fitonematóides^{4,6}.

Quando se avaliou o total de juvenis até as 336 h, no tratamento em que se utilizaram doses de ácido oleanólico (II), com posterior troca por água destilada, comparado com o controle, notou-se que a taxa de eclosão de J₂ demonstrou uma tendência de crescimento, ou seja, a presença dessa substância só estava causando um retardamento na eclosão, não sendo verificado morte dos J₂, caracterizando-se, portanto, um efeito nematostático.

Verificou-se que os valores de inibição da eclosão de J₂ (Tabela 1) mostraram um comportamento logarítmico explicado pela curva $Y = 21,671 \ln(X) + 3,3369$ com um $R^2 = 0,9809$ a 5% de significância (Fig. 4). À medida que a concentração da substância aumentou, o percentual de inibição teve um acréscimo rápido no início, tendendo à estabilização a partir de 400 (g.mL⁻¹), havendo um acréscimo de somente 13,2 % quando se passou para 800 µg.mL⁻¹.

Os valores de inibição obtidos com esta substância, *in vitro*, não foram tão altos quando comparados com os compostos nematicidas citados na literatura, como por exemplo, 2-metoxixantona, um dos componentes principais de *Mesua ferrea*. A inibição da eclosão de juvenis de *M. Javanica*, pelo uso do ácido oleanólico, foi cerca de 40% à concentração de 100 µg.mL⁻¹,

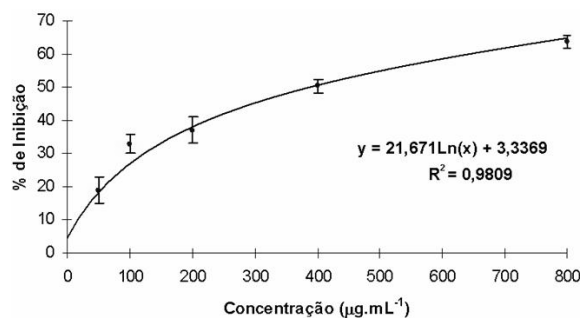


Figura 4. Efeito da concentração (em µg.mL⁻¹) do ácido oleanólico sobre a eclosão de juvenis *Meloidogyne incognita* raça 3 ao final de 240 horas.

Tratamento	Médias total de J ₂ eclodidos		
	até 240 horas	até 336 horas	% de inibição até 240 horas
800 µg.mL ⁻¹	1347,6 ± 164,3 ^a	2393,6 ± 304,7	63,55
400 µg.mL ⁻¹	1837,2 ± 304,0	2806,8 ± 430,7	50,31
200 µg.mL ⁻¹	2331,2 ± 319,8	3648,0 ± 560,9	36,95
100 µg.mL ⁻¹	2479,6 ± 376,4	3564,8 ± 611,8	32,93
50 µg.mL ⁻¹	2994,8 ± 515,3	3685,2 ± 688,2	19,00
Controle	3737,2 ± 312,0	4276,0 ± 328,1	0,00

Tabela 1. Médias acumuladas dos totais de juvenis (J₂) de *Meloidogyne incognita* raça 3, eclodidos na presença de ácido oleanólico (até 240 horas) a diferentes concentrações ou em água até 336 h. ^a desvio-padrão.

mas seu potencial em causar mortalidade de juvenis desse nematóide não foi avaliado. Sigh *et al.*¹ e Qamar *et al.*¹⁶ em trabalhos independentes observaram uma mortalidade de 72,4% e 70% de juvenis de *M. Incógnita*, respectivamente, quando utilizaram o ácido oleanólico. O que permite esperar maior potencial nematicida sobre juvenis do que sobre a eclosão de ovos de *M. Javanica*. Comparando as classes dos compostos testados com os descritos por Zuckerman *et al.*¹⁷ observou-se que a presença de grupamentos oxigenados (álcoois, ácidos, fenóis etc.) está relacionada com a potencialidade nematicida ou nematostática, ou seja, maior atividade de 7-epiclusianona e o ácido oleanólico em relação à mistura de sesquiterpenos.

CONCLUSÃO

Dos constituintes extraídos de *Rheedia gardneriana*, 7-epiclusianona, o ácido oleanólico e uma mistura de sesquiterpenos, que foram testados no controle in vitro do fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3, o ácido oleanólico foi o que apresentou melhor resultado. Este composto, um triterpeno pentacíclico, foi capaz de reduzir a população em 63,5% em 240 horas, na concentração de 800 µg.mL⁻¹, através de um efeito nematostático. A 7-epiclusianona apresentou baixa atividade de inibição de eclosão (20,16%), e a mistura de sesquiterpenos (C₁₅H₂₄) não demonstrou atividade inibitória, ambos a 100 µg.mL⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Singh, R.P.; S.S.Tomar, C. Devakumar & D.B. Sexana (1990) *Pesticide Res. J.* **2**: 61-8
- Barbosa, T.M.L. & R.L.O. Rigitano (1992) *Nematol. Bras.* **6**: 81-2
- Jourand P., S. Rapior, M. Fargette & T. Mateille (2004) *Nematology* **6**: 79-84.
- Ferraz, E.C.A., J.E. Orchard, & A.S. Lopez (1984) *Revista Theobroma* **14**: 217-27.
- Scramim, S., H.P. Silva, L.M.S. Fernandes & C.A. Yhan (1987) *Nematologia Brasileira* **11**: 89-102.
- Giebel, J. (1970) *Nematologica* **16**: 22-32.
- Sukul, N.C. (1992) *Indian Rev. Life Sci.* **12**: 23-52.
- Babu, S.P. & N.C. Sukul (1990) *Environ. Ecol.* **8**: 1118-20.
- Santos, M.H., N.L. Speziali, T.J. Nagem & T.T.Oliveira (1998) *Acta Cryst. C.* **54**: 1990-2.
- Santos, M.H. (1995) "Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* (PL & TR) e aplicações biológicas dos seus constituintes". Ed.UFV, Viçosa, 1995. pág. 119.
- Santos, M.H., T.J. Nagem, T.T. Oliveira & R. Braz-Filho (1999) *Química Nova* **22**: 654-60.
- Santos, M.H., T.T., Oliveira, T.J., Nagem, J.R., Oliveira, M.E.L.R., Queiroz, R.D. Lima, (1999) *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **35**: 297-301.
- Almeida Alves, T.M., R. Oliveira Alves, A.J. Romanha, M.H. Santos, T.J. Nagem & C.L. Zani (1999) *J. Nat. Prod.* **62**: 369-71.
- Lima, R.D. (1984) "Embriogênese, desenvolvimento pós-embriogênico e caracterização morfológica de *Meloidogyne exigna*" Ed. UFV, Viçosa, pág. 59.
- Chatterjee, A., N.C. Sukul, S. Laskar & S. Ghosmajundar (1982) *J. Nematol.* **14**: 118-20.
- Qamar, F., S. Begum, S.M. Raza, A. Wahab & B.S. Siddiqui (2005) *Nat. Prod. Res.* **19**: 609-13.
- Zuckerman, B.M., W.F.Mai & R.A. Rohde (1971) "Plant Parasit Nematodes I Morphology anatomy, taxonomy and ecology" Ed. Academic Press, N.Y. 1971. 345 p.