

ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Mucuna cinerea* CONTRA *Meloidogyne incognita* E *Heterodera glycines*

Antonio Jacinto Demuner*, Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Jeferson Chagas do Nascimento e Jessy James Vieira

Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa - MG

Maria Amelia dos Santos

Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia - MG

Recebido em 27/5/02; aceito em 8/10/02

ISOLATION AND NEMATOCIDAL ACTIVITY EVALUATION OF CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *Mucuna cinerea* AGAINST *Meloidogyne incognita* AND *Heterodera glycines*. Phytochemical investigation of the aerial parts and roots of *Mucuna cinerea* led to the isolation of a mixture of fatty acids, triacylglycerols, β -sitosterol, stigmasterol, stigmasterol glucoside, daucosterol, asperglaucide (4) and the isoflavonoids prunetin (1), genistein (2), medicarpin (3), daidzein (5), 7-O- α -glycopyranosyl daidzein (6). An *in vitro* bioassay was carried out with compounds 1-4, at the concentration of 50 and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against the phytonematodes *M. incognita* and *H. glycines*. Although the four compounds showed some nematocidal property, the most active was (1), causing 70% mortality of *M. incognita* at the concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords: nematodes; natural nematicides; velvet bean.

INTRODUÇÃO

O gênero *Mucuna* (Leguminosae) compreende aproximadamente 160 espécies. No Brasil, as espécies mais comumente encontradas são *M. deeringiana*, *M. utilis*, *M. pruriens*, *M. cochichinensis*, *M. nivea*, *M. capitata*, *M. hassjoo*, *M. diabolica*, *M. aterrima* e *M. cinerea* sendo que as principais diferenças entre as espécies cultivadas são as características da pubescência da vagem, a cor da semente e o tempo para a colheita da vagem¹. Estas espécies são muito utilizadas para adubação verde e para silagem, devido à grande quantidade de matéria orgânica de alta digestibilidade que produz e de sua capacidade de controlar fitonematóides¹⁻⁴.

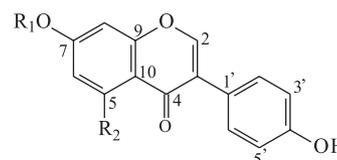
Poucos estudos químicos foram realizados neste gênero, sendo identificados isoflavonóides, antocianinas e antocianidinas⁵, C-glicosilflavonas⁶ e L-Dopa⁷. De *M. aterrima* foram isolados ésteres e ácidos graxos, esteróides e alantoina⁸⁻¹⁰. Suas sementes são constituídas principalmente de amido (40%), proteínas (17%) e lipídios (1,8%)¹¹.

O uso de *Mucuna* como controladora de fitonematóides¹²⁻¹⁴ estimulou o estudo químico de *Mucuna cinerea* e a avaliação da atividade nematicida sobre *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, das substâncias descritas pela primeira vez no gênero *Mucuna*.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF-301. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer FTIR 1000, na região de 600 a 4000 cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono 13 (RMN ¹³C) a 400 e 100 MHz, respectivamente, foram obtidos em aparelho Bruker WM 400 ou DRX 400. Para as separações cromatográficas em coluna, utilizou-se sílica gel 60 (70 - 230 Mesh-ASTM, Merck). Para as



- 1: R₁ = CH₃, R₂ = OH
- 2: R₁ = H, R₂ = OH
- 5: R₁ = R₂ = H
- 6: R₁ = gli, R₂ = H

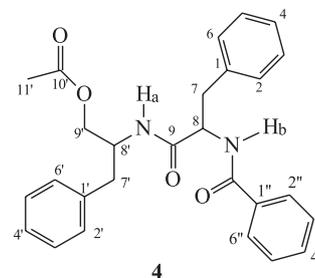
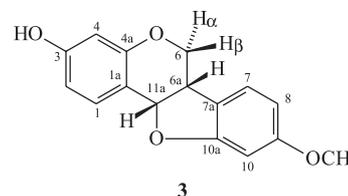


Figura 1. Compostos isolados de *M. cinerea*

análises cromatográficas em camada delgada, utilizaram-se placas da Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,25 mm de sílica gel com indicador de fluorescência UV₂₅₄). Os cromatogramas dos ésteres metílicos foram obtidos em um cromatógrafo Shimadzu GC 17-A equipado com um injetor automático (AOC 17), um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm),

*e-mail: ademuner@ufv.br

filme de 0,25 μm . O fluxo do gás de arraste (N_2) foi de 1,0 mL/min. As temperaturas utilizadas foram 200 °C para o injetor, 250 °C para o detector e, inicialmente, 150 °C para a coluna, com programação de aquecimento de 3 °C/min até atingir 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 40 min.

Preparo e quantificação dos ésteres metílicos por cromatografia em fase gasosa

A preparação dos ésteres metílicos a partir dos ésteres e ácidos graxos, para análise por cromatografia em fase gasosa, foi realizada de acordo metodologia descrita por Paula et al.¹⁵.

Material vegetal

A espécie *Mucuna cinerea* foi coletada em Viçosa, MG, em 1997. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, sob o número 9248.

Extração e purificação

Amostras, secas ao ar, de raiz (710 g) e caule (760 g) de *M. cinerea* foram moídas e submetidas à extração com etanol, a quente, em aparelho Soxhlet, durante 72 h. A remoção do solvente, por destilação em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, levou à obtenção de 41 g de extrato da raiz e 140 g do caule.

O extrato do caule foi submetido a sucessivos fracionamentos cromatográficos em coluna de sílica gel utilizando-se misturas de hexano-éter dietílico de polaridade crescente, sendo posteriormente agrupadas em 8 frações. A fração 1 (5,6 g) apresentou-se como um óleo amarelo pálido, caracterizado por infravermelho como sendo constituída de uma mistura de triacilgliceróis. Esta foi então submetida à reação de transesterificação com MeOH/MeONa¹⁶ fornecendo os ésteres metílicos correspondentes. A fração 2 (3,4 g), constituída de uma mistura de ácidos graxos, foi submetida à reação de esterificação com BF_3/MeOH ¹⁵ e os ésteres metílicos obtidos, assim como os da fração 1, foram analisados por cromatografia em fase gasosa.

As demais frações apresentaram-se como sólidos brancos, sendo a fração 3 (0,49 g) caracterizada como uma mistura de β -sitosterol + estigmasterol e a fração 4 (0,020 g), como uma mistura de daucosterol + estigmasterol glicosilado. As demais frações (5 a 8) apresentaram-se como compostos puros, sendo identificadas como: fração 5 (0,017 g), prunetina (1); fração 6 (0,041 g), genisteína (2); fração 7 (0,037 g), medicarpina (3) e fração 8 (0,044 g), asperglaucídeo (4).

O extrato etanólico da raiz foi também submetido a sucessivas separações cromatográficas em coluna de sílica gel utilizando-se misturas de hexano-acetato de etila de polaridade crescente. Esse procedimento resultou em três frações (9 a 11) que tiveram seus constituintes químicos caracterizados. A fração 9 foi caracterizada como uma mistura de ésteres graxos e, portanto, submetida ao mesmo procedimento da fração 1. A fração 10 (0,080 g) foi recristalizada em clorofórmio-metanol fornecendo a daidzeína (5) como um sólido amarelado. A fração 11 (0,100 g) também foi recristalizada em clorofórmio-metanol, resultando na obtenção de um sólido amarelo, identificado como daidzeína-7-O- α -glicopiranosídeo (6).

β -sitosterol, estigmasterol, daucosterol e estigmasterol glicosilado

Os dados espectroscópicos (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM) e as temperaturas de fusão desses compostos foram similares àqueles registrados na literatura^{15,17}.

Prunetina (4',5-diidroxi-7-metoxiisoflavona) (1): Tf. 235-237 °C (lit.¹⁸ 240 °C); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} 3384, 3050, 2960, 1668, 1614, 1570, 1518, 1358, 1030, 800; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,86 (s, 7-OCH₃), 6,41 (d, $J = 2,2$ Hz, H-6), 6,65 (d, $J = 2,2$ Hz, H-8), 6,82 (d, $J = 8,6$ Hz, H-5' e H-3'), 7,39 (d, $J = 8,6$ Hz, H-6' e H-2'), 8,40 (s, H-2), 9,60 (s, HO-4'), 12,96 (s, HO-5); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55,9 (H₃CO-7), 92,3 (C-8), 97,9 (C-6), 105,4 (C-10), 115,0 (C-3' e C-5'), 121,0 (C-1'), 122,4 (C-3), 130,0 (C-2' e C-6'), 154,3 (C-2), 157,4 (C-9), 157,5 (C-4'), 161,7 (C-5), 165,2 (C-7), 180,3 (C-4).

Genisteína (4',5,7-triidroxiisoflavona) (2): Tf. 296-297 °C (lit.¹⁸ 297-298 °C); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} 3440, 3050, 1655, 1577, 1516, 1370, 1244, 1046; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6,24 (d, $J = 2,2$ Hz, H-6), 6,39 (d, $J = 2,2$ Hz, H-8), 6,82 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3' e H-5'), 7,39 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2' e H-6'), 8,40 (s, H-2), 9,60 (s, HO-4'), 10,8 (s, HO-7), 12,96 (s, HO-5); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 94,0 (C-8), 99,0 (C-6), 104,4 (C-10), 115,0 (C-3' e C-5'), 121,2 (C-1'), 122,3 (C-3), 130,1 (C-2' e C-6'), 154,2 (C-2), 157,4 (C-4'), 157,6 (C-9), 162,0 (C-5), 165,3 (C-7), 180,2 (C-4).

Medicarpina (3-hidroxi-9-metoxipterocarpano) (3): Tf. 127-129 °C (lit.¹⁹ 127,5-128,5 °C); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} 3400, 3070, 2950, 2880, 1640, 1600, 1500, 1475, 1350, 1270, 1030, 950, 800; RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,52 (ddd, $J = 6,7, 10,9$ e 4,8 Hz, H-6a), 3,61 (dd, $J = 10,9$ e 10,9 Hz, H-6 α), 3,76 (s, 9-OCH₃), 4,23 (dd, $J = 10,9$ e 4,8 Hz, H-6b), 5,06 (s, HO-3), 5,48 (d, $J = 6,7$ Hz, H-11a), 6,40 (d, $J = 2,5$ Hz, H-10), 6,43-6,45 (m, H-4 e H-8), 6,54 (dd, $J = 8,3$ e 2,2 Hz, H-2), 7,12 (d, $J = 9$ Hz, H-7), 7,37 (d, $J = 8,3$ Hz, H-1); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ 39,7 (C-6a), 55,4 (OCH₃), 66,4 (C-6), 78,4 (C-11a), 96,8 (C-10), 103,6 (C-4), 106,3 (C-8), 109,6 (C-2), 112,5 (C-1a), 119,0 (C-7a), 124,6 (C-7), 132,1 (C-1), 156,5 (C-4a), 156,9 (C-3), 160,5 (C-10a), 161,0 (C-9).

Asperglaucídeo (acetato de N-benzoilfenilalanil-L-fenilalaninol) (4): Tf. 185-186 °C (lit.²⁰ 187-188 °C); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} 3312, 3032, 2924, 2860, 1726, 1661, 1632; RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,01 (s, H-11'), 2,72 (dd, $J = 14$ e 7,4 Hz, Ha-7'), 2,75 (dd, $J = 14$ e 7,4 Hz, Hb-7'), 3,04 (dd, $J = 13,4$ e 8,4 Hz, Ha-7), 3,21 (dd, $J = 13,4$ e 6,1 Hz, Hb-7), 3,80 (dd, $J = 11,6$ e 4,2 Hz, Ha-9'), 3,96 (dd, $J = 11,6$ e 4,8 Hz, Hb-9'), 4,29-4,36 (m, H-8'), 4,75 (ddd, $J = 8,4, 7,4$ e 6,1 Hz, H-8), 5,96 (d, $J = 7,4$ Hz, H-b), 6,70 (d, $J = 8,7$ Hz, H-a), 7,08 (d, $J = 5,4$ Hz, H-2' e H-6'), 7,11-7,17 (m, H-3', H-4', H-5'), 7,22-7,29 (m, 5H, H-2a H-6), 7,42 (m, H-3'' e H-5''), 7,51 (tt, H-4''), 7,69 (dt, H-2'' e H-6'').

Daidzeína (4',7-diidroxiisoflavona) (5): Tf. 312 °C (decompõe) (lit.¹⁸ 315 °C); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} 3500, 3220, 1610, 1570, 1520, 1490, 1280, 1240, 1115, 800; RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6,82 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3' e H-5'), 6,87 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8), 6,94 (dd, $J = 8,8$ e 2,1 Hz, H-6), 7,39 (d, $J = 8,8$ Hz, H-2' e H-6'), 7,98 (d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 8,28 (s, H-2), 9,54 (s, HO-4'), 10,78 (s, HO-7); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 102,1 (C-8), 115,0 (C-3' e C-5'), 115,2 (C-6), 116,7 (C-10), 122,6 (C-3), 123,6 (C-1'), 127,8 (C-5), 130,1 (C-2' e C-6'), 152,3 (C-2), 157,2 (C-4'), 157,5 (C-7), 162,6 (C-9), 174,8 (C-4).

Daidzeína-7-O- α -glicopiranosídeo (6): Tf. 229-231 °C (lit.¹⁸ 234 °C); IV $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} 3550-3300, 1610, 1570, 1520, 1490, 1280, 1240, 1110, 1050, 800; RMN ^1H (400 MHz, CD₃OD) δ 3,44-3,49 (m, H-4''), 3,55-3,57 (m, H-2''), 3,58-3,62 (m, H-5''), 3,70-3,71 (m, H-3''), 3,76 (dd, $J = 12,1$ e 2,4 Hz, Ha-6''), 3,96 (dd, $J = 12,1$ e 5,7 Hz, Hb-6''), 5,14 (d, $J = 7,7$ Hz, H-1''), 6,89 (d, $J = 8,8$ Hz,

H-3' e H-5'), 7,25 (dd, $J = 8,8$ e $2,1$ Hz, H-6), 7,28 (d, $J = 2,1$, H-8), 7,42 (d, $J = 8,8$ Hz, H-2' e H-6'), 8,18 (d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 8,21 (s, H-2), 9,54 (s, HO-4'); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ 62,6 (C-6''), 71,4 (C-4''), 74,8 (C-2''), 77,9 (C-3''), 78,4 (C-5''), 101,9 (C-1''), 102,1 (C-8), 115,0 (C-3' e C-5'), 115,2 (C-6), 116,7 (C-10), 122,6 (C-3), 123,5 (C-1'), 127,8 (C-5), 131,4 (C-2' e C-6'), 154,9 (C-2), 158,9 (C-4'), 159,2 (C-7), 163,5 (C-9), 178,6 (C-4).

Ensaio biológico

Para a avaliação da atividade nematicida dos compostos **1-4**, *in vitro*, os ensaios foram realizados com as espécies *M. incognita* e *H. glycines*, utilizando-se a metodologia do tubo invertido^{9,21}. Os ensaios foram realizados nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ao acaso e com 6 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração 1, obtida do caule, foi caracterizada pelo seu espectro no infravermelho como uma mistura de ésteres graxos. O tratamento dessa fração com MeONa/MeOH e posterior análise por cromatografia em fase gasosa (CG) resultou na identificação dos ésteres metílicos dos seguintes ácidos: mirístico (C14:0, 4%), palmítico (C16:0, 61%), esteárico (C18:0, 13%), oléico (C18:1, 7%), linoléico (C18:2, 4%) e icosanóico (C20:0, 2%).

A fração 9, obtida da raiz, apresentou-se semelhante à fração 1, sendo identificados os mesmos ésteres metílicos, aproximadamente nas mesmas proporções.

O espectro no infravermelho da fração 2 (3,4 g) apresentou bandas de absorção típicas de ácidos graxos ($3600\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ (v OH); 1710 cm^{-1} (v CO), 720 cm^{-1} ($\delta[\text{CH}_2]_n$, $n > 4$). A esterificação dessa fração com BF_3/MeOH , seguida de análise por CG, permitiu a identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos: mirístico (C14:0, 2%), palmítico (C16:0, 42%), esteárico (C18:0, 10%), oléico (C18:1, 9%), linoléico (C18:2, 24%), linolênico (C18:3, 11%) e icosanóico (C20:0, 1%).

A fração 3 (0,5 g) foi identificada como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol, na proporção de 1:1, conforme análise do seu espectro de RMN ^1H .

A fração 4 (0,02 g) foi identificada como uma mistura de daucosterol + estigmasterol β -D-glicosídeo, por comparação com uma amostra padrão e, ainda, por comparação de seus dados espectroscópicos com os da literatura¹⁵. A análise de seu espectro de RMN ^1H revelou uma proporção aproximada de 9:1, de seus respectivos constituintes.

A fração 5 apresentou-se como um sólido amarelo correspondente ao composto **1**. No seu espectro de RMN ^{13}C pode-se verificar a presença de sinais referentes à carbonila (δ 180,3) e metoxila (δ 55,9). No espectro de RMN ^1H , observou-se um singlete em δ 12,96 atribuído à hidroxila HO-5 e outro em δ 9,60, atribuído à hidroxila HO-4'. Observou-se também a presença de dois dubletos em δ 7,39 e δ 6,82, ambos integrados para dois hidrogênios, sendo estes atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6' ($J = 8,6$ Hz) e aos hidrogênios H-3' e H-5' ($J = 8,6$ Hz), respectivamente. Já o singlete em 3,86 δ , integrado para três hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios da metoxila.

A proximidade espacial da hidroxila (HO-4') com os hidrogênios H-5' e H-3', bem como dos hidrogênios H-6 e H-8 com a metoxila do carbono 7, foi determinada por experimentos de nOe (Tabela 1). Através destes, pode-se também verificar a proximidade entre H-2' e H-2.

O composto **1**, conhecido como prunetina, é encontrado em diversas espécies de leguminosas do gênero *Prunus*, como *P.*

Tabela 1. Efeito nuclear Overhause (nOe) observado para alguns hidrogênios irradiados nos isoflavonóides **1** e **2**

H irradiados	nOe observados	
	1	2
HO-5	H-6	H-6
H-2	H-2'	H-2'
HO-4'	H-5', H-3'	H-5', H-3'
$\text{CH}_3\text{O-7}$	H-6, H-8	-
HO-7	-	H-6, H-8
H-8	$\text{CH}_3\text{O-7}$	HO-7
H-6	$\text{CH}_3\text{O-7}$, HO-5	HO-7, HO-5

aequinocialis, *P. nipponica*, *P. maximowiczii* e *P. avium*²². A prunetina também foi isolada da bactéria *Mycobacterium phlei*²³. No entanto, não foi verificado, na literatura, qualquer relato sobre a sua ocorrência no gênero *Mucuna*.

Da fração 6 (0,041 g), foi isolada a genisteína (**2**) que, apesar de ser uma substância amplamente distribuída em plantas^{22,24} e outros organismos vivos²³, a sua ocorrência no gênero *Mucuna* está sendo originalmente descrita neste trabalho.

O espectro de RMN ^1H do composto **2** apresentou-se bastante semelhante ao do composto **1**. A principal diferença é a ausência do sinal referente à metoxila e a presença de um outro sinal alargado em δ 10,8, atribuído à hidroxila (HO-7). As atribuições dos sinais no espectro de RMN ^1H foram confirmadas pelos experimentos de nOe (Tabela 1).

O espectro de RMN ^{13}C da fração 7 (0,017 g, composto **3**) mostrou um total de 16 sinais, sendo observados sinais em δ 66,4, atribuído ao carbono metilênico C-6, e em δ 55,4, atribuído à metoxila. O espectro de RMN ^1H apresentou sinais correspondentes a 14 hidrogênios. O singlete em δ 3,76, integrado para três hidrogênios, foi atribuído à metoxila (9-OCH₃) e o sinal largo em δ 5,06 foi atribuído à hidroxila (3-OH).

Através dos experimentos de nOedif foi possível confirmar a localização da metoxila e da hidroxila nos anéis benzênicos e, também, a estereoquímica *cis* dos hidrogênios H-6a e H-11a. Quando H-11a foi irradiado, observou-se nOe em H-6a (5,7%) e H-1 (3,4%). Quando H-6a foi irradiado, observou-se nOe em H-11a (5,7%), H-6 β (5,7%) e H-7 (1,4%). Ao irradiar H-6 α observou-se um maior valor de nOe em H-6 β (21,8%) e a irradiação de H-6 β mostrou nOe de 5,7% em H-6a e 21,8% em H-6 α .

O composto **3**, conhecido como medicarpina, já foi isolado de algumas leguminosas, como *Andira inermis*, *Dalbergia stevensonii*, *D. nitidula*, *D. variabilis* e *Swartzia madagascariensis*^{19,25,26}, porém, não foi encontrado registro do isolamento do mesmo em plantas do gênero *Mucuna*.

O espectro no infravermelho da fração 8 (composto **4**) apresentou uma forte banda de absorção em 3312 cm^{-1} (O-H), além de absorções em 3032 cm^{-1} (C-H de carbono insaturado), em 1726 cm^{-1} (C=O de éster) e em 1632 cm^{-1} (C=O de amida).

No espectro de RMN ^{13}C , verificou-se a presença de três sinais, em δ 170,7, 170,1 e 167,0, referentes às carbonilas, além de 15 sinais de carbonos aromáticos compreendidos entre δ 126 e 130.

Pela análise do seu espectro de RMN ^1H , pode-se observar a presença de um singlete em δ 2,01, integrado para três hidrogênios, que foi atribuído ao grupo $\text{CH}_3\text{-CO}$. Os dubletos alargados em δ 5,96 e 6,70, integrados para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios H-a e H-b, respectivamente. Pela análise desse espectro pode-se observar a presença de sinais de hidrogênios aromáticos na região de δ 7,10-7,80. A análise de todos os dados espectros-

cópicos resultou na proposição da estrutura **4** para o composto dessa fração.

Através do experimento de nOedif (Tabela 2), pode-se observar a proximidade espacial dos hidrogênios dos anéis aromáticos com os hidrogênios H-b, H-7, H-8, H-8' e H-9', bem como a proximidade dos hidrogênios H-b com H-8 e H-a com H-8' e H-8.

Tabela 2. Dados de nOe observados para alguns hidrogênios irradiados no composto **4**

H irradiados	nOe observados (%)
H-8'	H-9' (1,8), H-7' (4,9), H-a (2,4), H-2' e H-6' (1,3)
H-8	H-7 (3,5), H-a (6,9), H-b (2,3)
H-a	H-8 (6,9), H-8' (2,4)
H-b	H-8' (3,7), H-8 (2,3)
H-7'	H-8' (4,9), H-2' e H-6' (2,6), H-9' (1)
H-2'' e H-6''	H-b (3,7)
H-2 e H-6	H-7 (3,2), H-8 (1)
H-2' e H-6'	H-8' (1,3), H-7' (2,6)

O composto **4**, conhecido como asperglaucídeo, foi primeiramente isolado do fungo *Aspergillus glaucus*²⁶ e, também, da alga *Cystoseira corniculata* Hauck²⁰. Entretanto, o mesmo ainda não havia sido identificado em leguminosas do gênero *Mucuna*.

As frações 10 e 11 foram obtidas a partir das raízes, sendo ambas constituídas de sólidos amarelos claro. Pela análise dos dados de RMN ¹H e ¹³C, e comparação com os dados da literatura¹⁸, foi possível identificar, inequivocamente, os constituintes dessas frações como os isoflavonóides daidzeína (**5**) e daidzeína 7-O- α -glicopiranosídeo (**6**).

Avaliação da atividade nematocida dos compostos isolados de *M. cinerea*

No primeiro ensaio, com as amostras (compostos **1-4**) na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ observou-se que apenas dois compostos causaram taxa de mortalidade superior a 50% para *M. incognita*, sendo estes a prunetina (**1**, 70%) e a genisteína (**2**, 57%). A análise de variância confirmou o efeito significativo das amostras sobre os juvenis de *M. incognita*. Para a mesma concentração (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), no ensaio com o nematóide *H. glycines*, nenhum dos compostos testados apresentou efeito significativo (Tabela 3).

No segundo ensaio, utilizando as amostras com concentração final de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se redução nas taxas de mortalidade. Com o nematóide *M. incognita* apenas o asperglaucídeo (**4**) não causou mortalidade significativa em relação ao controle. Para *H. glycines*, nenhum dos compostos testados na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ causou efeito significativo sobre a mortalidade dos juvenis (Tabela 3).

Estes resultados mostram que, em relação ao nematóide *M. incognita*, mais de uma classe de compostos (isoflavonóide e amida) está associada à atividade nematocida.

Considerando que os compostos ativos isolados, no presente trabalho, encontram-se em quantidade muito pequena na planta, e que a mesma apresenta comprovada ação nematocida no campo^{1-4,27}, é possível que esse efeito seja devido não somente a estas substâncias, mas também, a outras substâncias presentes na mesma, que não foram identificadas, ou ainda, a substâncias comuns, tais como β -sitosterol, estigmasterol, ácidos e ésteres graxos, presentes em maior concentração e que também apresentam acentuada atividade nematocida¹⁰.

Tabela 3. Número de juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines* (após 48 h + 48 h) partindo de um inóculo, contendo 400 nematóides, submetido a diferentes compostos de *Mucuna cinerea* nas concentrações de 50 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidade			
		<i>M. incognita</i>		<i>H. glycines</i>	
		Nº. de Nematóides*	%	Nº. de Nematóides	%
Controle	50	353,0 a**	0,0	359,5 a	0,0
	5	347,0 a	0,0	341,7 a	0,0
1	50	106,0 e	70,0	325,0 a	9,5
	5	196,0 c	43,5	335,0 a	2,0
2	50	152,0 d	57,0	333,0 a	7,1
	5	286,0 b	17,6	322,0 a	5,8
3	50	247,7 c	30,0	362,7 a	0,0
	5	290,2 b	16,4	328,7 a	3,8
4	50	296,8 b	16,2	314,7 a	12,5
	5	321,2 a	7,5	327,2 a	4,1
CV (%)	50	—	14,24	—	12,63
	5	—	13,37	—	13,54

* Médias de seis repetições (três contagens por repetição). ** As médias seguidas pela mesma letra, para a mesma concentração, são iguais entre si pelo teste de agrupamento de Scott- Knott, a 5 % de probabilidade.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo de J. C. do Nascimento e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

pelas bolsas de pesquisa de A. J. Demuner e L. C. de A. Barbosa e à International Foundation for Science (IFS Grant 2281/1, Suécia) e Fundação de Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. Ao Dr. O. Howarth (Universidade de Warwick, UK) pela obtenção de alguns dos espectros de RMN.

REFERÊNCIAS

1. Buckles, D.; *Economic Botany* **1995**, *49*, 13.
2. Tenente, R. C. V.; Lordello, L. G. E.; Dias, J. F. S.; *Fitopatologia Brasileira* **1984**, *9*, 145.
3. Siddhuraju, P.; Karuppanan, V.; Janardhanan, K.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2636.
4. Sharma, R. D.; Pereira, J.; Resck, D. V. S., ed. Em *Adubação Verde no Brasil*; Fundação Cargill: Campinas, 1984, p. 42-43.
5. Costa, V. S. A.; Pessanha, G. G.; Carvalho, G. M.; Filho, B. R.; *Revista Ceres* **1995**, *42*, 584.
6. Ishikura, N.; Yoshitama, K.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1555.
7. Fujii, Y.; Shibuya, T.; Yasuda, T.; *Japan Agric. Res. Quartely* **1992**, *25*, 238.
8. Nogueira, M. A.; Oliveira, J. S.; Ferraz, S.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 997.
9. Barbosa, L. C. A.; Barcelos, F. F.; Demuner, A. J.; Santos, M. A.; *Nematropica* **1999**, *29*, 81.
10. Barcelos, F. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 1997.
11. Seno, M. S.; Gomes, L.; Cortelazzo, A. L.; *Bragantia* **1996**, *55*, 57.
12. Gonzaga, V.; Ferraz, S.; *Nematologia Brasileira* **1994**, *18*, 43.
13. Moura, R. M.; *Revisão Anual de Patologia de Plantas* **1996**, *4*, 209.
14. Weaver, D. B.; Rodriguez-Kábana, R.; Carden, E. L.; *J. Nematol.* **1993**, *25*, 809.
15. Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Veloso, D. P.; Howarth, O. W.; *Eclética Química* **1998**, *23*, 45.
16. Christie, W. W.; *Lipid Analysis*, 2nd ed., Pergamon Press: Oxford, 1987.
17. Agrawal, P. K.; *Phytochemistry* **1982**, *31*, 3307.
18. *The Merck Index*, 11^{ed}, 1991.
19. McMurry, T. B. H.; Martin, E.; *Phytochemistry* **1972**, *11*, 3283.
20. Maiti, B. C.; Thomson, R. H.; *Experientia* **1976**, *32*, 1106.
21. Tsai, B. Y.; West, J.; Van Gundy, S. D. Em *Phytochemical Pesticides*; Kubu, I.; Jacobson, M., eds.; CRC Press: Oxford, 1991, p.1-26.
22. Hasegawa, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1738.
23. Hudson, A. T.; Bentley, R.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1969**, 830.
24. Markham, K. R.; Mabry, T. J.; *Phytochemistry* **1968**, *7*, 791.
25. Letcher, M. R.; Shirley, M. I.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 353.
26. Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Sutherland, O. I.; Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1417.
27. Valle, L. A. C.; Ferraz, S.; Dias, W. P.; Teixeira, D.; *Nematologia Brasileira* **1996**, *20*, 2.