



KARINA CAMPOS LOPES

SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE
Meloidogyne incognita

LAVRAS - MG

2015

KARINA CAMPOS LOPES

SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Lopes, Karina Campos.

Substâncias para o controle de *Meloidogyne incognita* / Karina Campos Lopes. – Lavras: UFLA, 2015.
47 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. Nematoides de galhas. 2. Atividade nematicida. 3. Cloreto de 23,5-trifeniltetrazólio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

KARINA CAMPOS LOPES

SUBSTÂNCIAS PARA O CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dr. Rafael César Russo Chagas UFSJ

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

LAVRAS – MG
2015

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

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

Aos professores do Departamento de Química e do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos e concessão de espaço para o desenvolvimento de vários trabalhos.

Ao professor Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação, ensinamentos e lições que foram de grande valia profissional e pessoal.

Aos professores, Dr. Vicente Paulo Campos, Dr. Teodorico de Castro Ramalho e Dr. Matheus Puggina de Freitas, pelos ensinamentos, paciência, tranquilidade e amizade. Aos amigos, Eduardo Souza Freire, Willian César Terra, Iselino Nogueira Jardim, pelos dias de semana e finais de semana me ajudando e transmitindo conhecimento.

Aos meus pais, Joaquim Lopes Pereira Filho e Maria de Fátima Campos Pereira, e irmãos, Camilla Campos Lopes e Rodrigo Campos Lopes, pelo apoio, conselhos e paciência. Ao meu noivo, Atílio José Bruzigues Lopes, pela ajuda preciosa em todos os momentos que precisei, sendo pelo telefone ou como ajudante nos finais de semana, pelo carinho, compreensão, conselhos e principalmente, pela paciência e confiança em mim. Aos meus amigos do Grupo Cimed, pelo apoio, oportunidades e compreensão.

A Deus e Santa Terezinha, que sempre estão comigo, protegendo e guiando meus passos.

RESUMO

Os nematoides de galhas causam enormes prejuízos a vários agricultores em todo o mundo, sendo responsáveis pela redução na produção e no valor comercial de diversos produtos agrícolas. Dentre esses fitoparasitas se encontra a espécie *Meloidogyne incognita*, que se destaca devido a sua ampla adaptação às diversas condições ambientes e às ineficiências dos métodos para o seu controle. Apesar de haver diversos estudos objetivando o desenvolvimento de novos métodos para o combate desse fitoparasita, ainda não se conseguiu alcançar procedimentos que sejam não poluentes, economicamente viáveis e eficientes em todas as situações agronômicas. Consequentemente, investimentos em pesquisas nesta área são imperativos para que novos métodos de controle de *M. incognita* sejam desenvolvidos. Uma possibilidade interessante para satisfazer esta demanda consiste em utilizar substâncias naturais ativas contra nematoides como ponto de partida para a busca por substâncias análogas, cujas atividades nematicidas sejam maiores que as observadas nas substâncias naturais. Em decorrência, no presente trabalho foram investigadas as atividades nematicidas *in vitro* de 35 substâncias análogas da diidrouacila e 9H-purina, já que tais substâncias se mostraram ativas contra *Meloidogyne exigua* em trabalho anterior. Dentre as substâncias estudadas, observou-se que ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**), ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**), ácido orótico (**14**), cloreto de 2,3,5-trifenilólio (**35**), pirazinocarboxilato de metila (**17**) e 2,4-diaminopirimidina (**13**) causaram, respectivamente, as seguintes imobilidades e mortalidade para juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*: 98,8 e 91,9%; 92,7 e 89,3%; 90,1 e 88,5%; 90,7 e 81,8%; 71,4 e 68,5%; 66,3 e 64,6%. Quando submetidas a teste com mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara) inoculadas com *M. incognita*, as substâncias que mais se assemelharam ao nematicida comercial carbofuran (N-metilcarbamato de 2,3-diidro-2,2-dimetil-1-benzofuran-7-ila) foram **13**, **35** e **16**, que reduziram o número de ovos e de galhas do nematoide a valores que correspondiam a menos de 52, 51 e 26%, 55, 19 e 31%, respectivamente, do observado para o controle negativo, que correspondeu ao veículo empregado para dissolver as amostras. Assim, pode-se concluir que **13**, **35** e **16** são substâncias promissoras no combate de *M. incognita*.

Palavras-chave: Nematoides de galhas. Atividade nematicida. Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. 2,4-diaminopirimidina. Ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico.

ABSTRACT

The root-knot nematodes cause huge losses to many farmers around the world, and they are responsible for reducing production and commercial value of many agricultural products. Among these plant parasites there is the *Meloidogyne incognita* species, which stands out due to its broad adaptation to various environmental conditions and inefficiencies in its control methods. Although there are many studies trying to develop new methods to combat this phytoparasite, none of them has yet resulted in a procedure not pollutant, economically feasible and efficient in all agronomic situations, simultaneously. Consequently, investment in research in this area is imperative so that new methods to control *M. incognita* can be developed. An interesting possibility to meet this demand is using natural substances active against nematodes as starting points for the search for similar substances with greater nematicidal activities than those observed in natural substances. Therefore, in this work, *in vitro* assays were used to study the nematicidal activities of 35 substances similar to dihydrouracil and 9H-purine, because these substances proved to be active against *Meloidogyne exigua* in a previous work. Among the studied substances, it was observed that 2-pyrazinecarboxylic acid (**15**), 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid (**16**), orotic acid (**14**), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (**35**), methyl pyrazinecarboxylate (**17**), and 2,4-diaminopyrimidine (**13**) caused, respectively, the following immobility and mortality of second stage juveniles (J2) of *M. incognita*: 98.8 and 91.9%, 92.7 and 89.3%, 90.1 and 88.5%, 90.7 and 81.8%, 71.4 and 68.5%, 66.3 and 64.6%. When subjected to an assay with tomato plants (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara) inoculated with *M. incognita*, substances that most resembled carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methylcarbamate) were **13**, **35** and **16**, which reduced the numbers of nematode eggs and galls to less than 52, 51 and 26%, 55, 19 and 31%, respectively, of that observed for the negative control, which was the vehicle used to dissolve the samples. Thus, **13**, **35** and **16** are promising substances to control *M. incognita*.

Keywords: Root-knot nematode. Nematicidal activity. 2,3,5-triphenyltetrazolium. 2,4-diaminopyrimidine. 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Estruturas químicas de substâncias de origem bacteriana com atividade contra *Meloidogyne exigua* 15

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

- Figura 1 Estruturas químicas, nomes, códigos, fornecedores e purezas da diidrouracila e de seus análogos 27
- Figura 2 Estruturas químicas, nomes, códigos, fornecedores e purezas das substâncias análogas da 9H-purina 28
- Tabela 1 Efeitos das substâncias sobre a motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* 34
- Figura 3 Efeitos das substâncias orgânicas sobre a população de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. Barras com a mesma letra, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$). **13**: 2,4-diaminopirimidina (9,7 $\mu\text{mol/mL}$); **14**: ácido orótico (3,5 $\mu\text{mol/mL}$); **15**: ácido 2-pirazinocarboxílico (2,4 $\mu\text{mol/mL}$); **16**: ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (7,6 $\mu\text{mol/mL}$); **17**: pirazinocarboxilato de metila (1,5 $\mu\text{mol/mL}$); **35**: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ($7,0 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL}$); **C**: carbofuran (1,9 $\mu\text{mol/mL}$); **T**: Tween 80 a 0,01 g/mL 37

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
	REFERÊNCIAS	19
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	23
	ARTIGO 1 Substâncias análogas da diidrouracila e 9H-purina reduzem a população de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiros	23
1	INTRODUÇÃO	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
3	RESULTADOS	33
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides, vulgarmente conhecidos como vermes cilíndricos perfazem cerca de 26.500 espécies descritas, mas se acredita que o número total possa chegar a milhões. Apesar de a maioria das espécies serem de vida livre, aquelas parasitas de plantas e animais causam grandes preocupações ao homem, encontrando-se amplamente disseminadas pelo mundo (HUGOT; BAUJARD, MORAND, 2001; LEY, 2000). Todas as espécies vegetais cultivadas são atacadas pelos nematoides parasitas de plantas, que também são denominados nematoides fitoparasitas ou fitonematoides e acarretam redução na produção e no valor comercial de diversos produtos agrícolas (DIAS-ARIEIRA; MOLINA; COSTA, 2008; TIHOHOD, 2000).

Estima-se que perdas de até 12,7% sejam ocasionadas na produção mundial de grãos por fitonematoides e, dependendo da cultura e de sua localização, as perdas podem variar de 35 a 90% da produção agrícola. Tais percentagens correspondem a um prejuízo mundial superior a US \$100 bilhões nas colheitas anuais (BIRD; OPPERMAN; WILLIAMSON, 2009; MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2008). Dentre as espécies fitoparasitas se destacam os nematoides de galhas, que são aqueles pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (MOLINARI, 2009). Em geral, esses são os nematoides mais prejudiciais para a agricultura, pois possuem um vasto número de plantas hospedeiras e grande capacidade de adaptação aos diversos agroecossistemas. Além disso, quando em condições favoráveis de temperatura e umidade, reproduzem e desenvolvem-se durante todo o ano. Em condições inadequadas, como as observadas em regiões sob o frio severo ou seca prolongada, entram em

estado de latência (BARKER; PEDERSON; WINDHAM, 2002; LORDELLO, 1981; MOLINARI, 2009; ZACHEO, 1993).

Devido à ampla distribuição geográfica, polifagia e variabilidade fisiológica de *Meloidogyne* spp., é difícil o estabelecimento de medidas eficientes de controle desses fitoparasitas, que causam problemas para diversas culturas no país. Espécies como *Meloidogyne javanica* (Treub) e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, ainda representam sérios problemas em várias regiões agrícolas, pois causam grandes prejuízos econômicos aos agricultores (ASMUS; ANDRADE, 1996; DALL'AGNOL; ANTONIO; BARRETO, 1984; DIAS et al., 2010; JAHEN; MENDES; SILVA, 1998).

Existem vários métodos que almejam reduções das populações dos nematoides fitoparasitas, como o controle químico e biológico, a rotação de cultura, o uso de cultivares resistentes e de produtos naturais. Todos possuem falhas como, por exemplo, ineficiência, alta toxicidade do produto a organismos não alvos ou a inviabilidade econômica do método, tornando cada vez maior a demanda por novas metodologias ou por produtos que sejam mais eficientes e, ao mesmo tempo, menos onerosos e tóxicos ao homem e ao ambiente (CHITWOOD, 2002).

Para satisfazer a tal demanda vários grupos de pesquisas têm demonstrado o potencial dos produtos naturais que, em princípio, podem ser diretamente empregados no controle do nematoide, ou na busca por estruturas químicas análogas às substâncias naturais, que sejam mais eficientes como nematicidas.

Conseqüentemente, neste trabalho o objetivo foi avaliar as atividades nematicidas de 35 substâncias análogas da diidrouacila e da 9H-purina que, segundo trabalho previamente realizado (OLIVEIRA et al., 2014), tratam-se de substâncias naturais ativas contra *Meloidogyne exigua* (Goeldi). Para tanto, as

estruturas análogas foram submetidas a testes *in vitro* com *M. incognita* e, as mais ativas, foram empregadas em teste *in vivo* com o referido nematoide.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nematoides das Galhas

Os nematoides de galhas foram relatados pela primeira vez em 1855, por Berkeley, que observava os danos causados por esses fitoparasitas em pepino. Até o trabalho de Chitwood em 1949, todos os nematoides de galhas eram caracterizados como *Heterodera marione*. A partir de então, várias espécies foram caracterizadas no gênero *Meloidogyne*, uma palavra de origem grega que significa fêmea em forma de maçã (BARKER; PEDERSON; WINDHAM, 1998; KARSSSEN, 2002; LAMBERTI; TAYLOR, 1979).

Hoje são conhecidas mais de 90 espécies de nematoides do gênero *Meloidogyne* (KARSEN; MOENS, 2006), que parasitam mais de 2000 plantas hospedeiras (PERRY; MOENS; STAR, 2009). Dentre tais espécies se destacam *M. exigua*, *M. incognita* e *M. javanica*, por possuírem um grande número de plantas hospedeiras e por serem, em vários casos, os principais causadores de prejuízo na agricultura (NASU et al., 2010).

O desenvolvimento embrionário dos nematoides de galhas no ovo resulta no juvenil de primeiro estágio (J1), que passa por uma ecdise, dando origem ao juvenil do segundo estágio (J2). Este eclode do ovo e migra pelo solo em direção à raiz da planta hospedeira, na qual ele penetra através da região meristemática. Em seguida, o J2 migra até a zona de diferenciação das células vegetais. Através de um estilete, o J2 deposita vários produtos salivares nas células vegetais para induzi-las à formação de células gigantes, das quais retirará os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Uma vez estabelecido o seu sítio de alimentação, o J2 se torna sedentário, passando por mais três ecdises até a fase adulta. O ciclo de vida, de ovo a ovo, dura, em média, quatro semanas

e uma fêmea é capaz de produzir até 2500 ovos por ciclo. Para *M. incognita* em tomateiro, a 29 °C, as primeiras fêmeas aparecem de 13 a 15 dias após a penetração nas raízes e as primeiras massas de ovos após 19 a 21 dias. Normalmente, as fêmeas produzem ovos por três semanas (MOENS; PERRY; STARR, 2009). Em decorrência do parasitismo dos nematoides de galhas, engrossamentos radiculares denominados galhas são formados nas raízes infectadas. As galhas resultam dos processos de hipertrofia e hiperplasia nas células próximas ao sítio de alimentação. O número, bem como o tamanho da galha dependerão fundamentalmente de três fatores: densidade populacional, espécie e raça do nematoide e espécie e cultivar/variedade de planta hospedeira (SASSER; CARTER, 1985; BARKER; PEDERSON; WINDHAM, 1998; CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005; DIAS-ARIEIRA; MOLINA; COSTA, 2008).

Em condições normais, para *Meloidogyne* spp., a quase totalidade dos adultos é de fêmeas. Porém, em condições ambientais desfavoráveis os juvenis que se desenvolveriam em fêmeas se tornam machos. Tal processo, denominado reversão sexual, é um dos mecanismos de sobrevivência desses parasitas, pois menos ovos serão produzidos e o parasitismo sobre a planta infectada será reduzido, garantindo a sobrevivência de algumas fêmeas (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2006).

Apesar de os nematoides do gênero *Meloidogyne* atacar as raízes, causando galhas, observam-se clorose e menor crescimento da parte aérea da planta, ocasionando menor produção agrícola e comprometendo ou até inviabilizando o cultivo. Quando em altas densidades, os nematoides de galhas podem matar a planta, especialmente no início da estação de crescimento, quando as plantas se encontram no período de menor massa do sistema radicular. Em densidades abaixo da fatal, as plantas infetadas podem murchar, já que as

raízes galhadas apresentam capacidade limitada de absorver e transportar água e nutrientes para o resto da planta. Quando severamente atacadas pelo nematoide, as plantas podem murchar mesmo em solos úmidos, especialmente após o meio dia, quando as temperaturas são mais elevadas. Ademais, elas apresentam deficiências nutricionais e sofrem estresse, o que as torna mais vulneráveis a várias outras doenças (KARSSSEN, 2002; LAMBERTI; TAYLOR, 1979; TIHOHOD, 2000).

Os nematoides de galhas podem ser encontrados em todas as regiões cultiváveis do mundo, devido ao fato de possuírem ampla adaptação aos diferentes ambientes existentes e, em geral, por possuírem um vasto número de plantas hospedeiras. Para algumas espécies há centenas de plantas hospedeiras. Isso pode fazer com que seja extremamente difícil o controle do nematoide, principalmente devido ao fato de algumas espécies poderem sobreviver em plantas daninhas e/ou interagir com fungos fitopatogênicos habitantes do solo em áreas cultivadas, o que dificulta ainda mais os seus controles (BARKER; PEDERSON; WINDHAM, 1998; KARSSSEN, 2002; LAMBERTI; TAYLOR, 1979; SASSER; CARTER, 1985).

2.2 Métodos de controle de *Meloidogyne spp.*

O controle preventivo, sempre que possível, ainda é a melhor forma de se evitar perdas com fitonematoides. Fundamentalmente, essas técnicas consistem em utilizar áreas não infestadas e evitar que o nematoide venha a contaminar a área. Para tanto, deve-se, por exemplo, empregar mudas saudáveis e utilizar equipamentos limpos. Se a infestação da área plantada acontecer, outros métodos de controle deverão ser empregados. Uma possibilidade bastante estudada consiste no controle biológico, que corresponde ao emprego de micro-

organismos antagonísticos aos nematóides, normalmente fungos ou bactérias. Há vários fungos nematófagos, que empregam seus micélios como armadilhas ou produzem esporos que aderem à cutícula do nematoide, destruindo-o. Já no caso das bactérias, destacam-se as do gênero *Pasteuria*, cujos endósporos se aderem à cutícula do nematoide, na qual germina para, em seguida, penetrar no nematoide (KARSSSEN, 2002; SASSER; CARTER, 1985). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vem incentivando o produtor rural a utilizar produtos biológicos, cujos registros têm sido facilitados (BRASIL, 2013).

Esses agentes de controle biológico também podem agir contra o nematoide através da produção de substâncias nematicidas. Para exemplificar é possível citar o trabalho de Oliveira et al. (2014) para o controle de *M. exigua* com as bactérias *Bacillus cereus* (Frankland & Frankland) e *Bacillus subtilis* (Ehrensberg) Cohn. Os autores observaram a produção de uracila, diidrouracila e 9H-purina, que se mostraram ativas contra este nematoide.



Figura 1 Estruturas químicas de substâncias de origem bacteriana com atividade contra *Meloidogyne exigua*

Outra possibilidade para o controle de fitonematoides consiste no emprego de métodos culturais, como a rotação com culturas resistentes ou não hospedeiras. Este método também é eficiente, porém, para que se alcance sucesso é necessário planejamento e investimento de tempo e de recursos financeiros. Ainda assim, existem várias culturas, principalmente as perenes, que

apresentam grandes dificuldades para a implementação de tais metodologias (STARR; BRIDGE; COOK, 2002; SASSER; CARTER, 1985; VIAENE, 1998).

Há também o emprego de cultivares resistentes e tolerantes aos nematoides. As cultivares resistentes foram definidas por Parlevliet (1997) como plantas com capacidade de suprimir, retardar ou prevenir a entrada, crescimento e desenvolvimento do patógeno em seus tecidos. Já as cultivares tolerantes suportam a doença, sem perdas severas na sua produtividade e qualidade. Ou seja, o patógeno pode invadir a planta, mas não a afeta de maneira muito severa.

Há relatos de utilização de várias cultivares resistentes a *M. incognita*. Em alguns casos, está comprovado que, na presença do nematoide, as plantas produzem metabólitos que contribuem para a diminuição da população do nematoide na raiz da cultivar e no solo (CAMPOS et al., 2012). Logo, estas substâncias apresentam potencial para emprego no desenvolvimento de novos produtos para o controle de fitonematoides.

Do ponto de vista produtivo, o uso de cultivares resistentes é interessante em áreas infestadas pelo nematoide, embora algumas delas possuam baixa produtividade quando comparadas com as cultivares suscetíveis. Além disso, a resistência ao nematoide geralmente implica em suscetibilidade a outras doenças que podem, dependendo das condições, acarretar perdas inaceitáveis para os agricultores. Além disso, em altas densidades populacionais do nematoide, a reação de resistência das cultivares pode sofrer alterações, já havendo relatos de seleção de nematoides capazes de parasitar cultivares resistentes ao nematoide (ARANTES et al., 2010).

Várias substâncias de origem natural, geralmente chamadas de produtos naturais, vêm sendo estudadas com vistas ao desenvolvimento de novos nematicidas economicamente viáveis e menos agressivos ao meio ambiente e ao homem. Um exemplo consiste no isômero III da gliceolina, que se trata de uma

fitoalexina produzida por cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) resistentes a nematoides. Esta substância, bem como os seus isômeros, que podem ser encontrados nas paredes celulares de tais cultivares, mantêm as plantas livres de alguns microrganismos e também é capaz de inibir a motilidade de *M. incognita* quando em concentrações na faixa de 12 a 22 µg/mL (KAPLAN; KEEN; THOMASON, 1980). Porém, segundo estudos de Huang e Barker (1991), a concentração máxima que se obtém do isômero I é de 8µg/g de raiz de soja após oito dias da inoculação de J2 de *M. incognita*. Esta é uma concentração relativamente baixa quando comparada a de alcaloides, que foi de 150 mg/g de raiz de soja logo após a inoculação de J2 de *M. incognita* em plantas resistentes à tal nematoide, enquanto em plantas de soja suscetíveis, nas mesmas condições, a concentração de alcaloides foi de 1 mg/g de raiz (CAMPOS et al., 2012)

Uma possibilidade bastante empregada para a redução populacional de fitonematoides consiste no controle químico, que corresponde ao emprego de substâncias nematicidas, geralmente de origem totalmente sintética, que podem atuar de forma sistêmica ou apenas por contato (DIAS et al., 2010). Tais produtos se mostram altamente tóxicos a seres humanos e a organismos benéficos ao ambiente em geral. Para exemplificar, é possível citar o Aldicarbe [O-(N-metilcarbamoil) oxima do 2-metil-2-(metiltio)propanal], que foi proibido no Brasil em outubro de 2012 devido à alta incidência de intoxicações humanas e de envenenamentos de animais. Outro exemplo é o Metamidofós (fosforamidotioato de O,S-dimetila), que foi proibido no Brasil em julho de 2012, por ser responsável por prejuízos ao desenvolvimento embrionário, apresentar características neurotóxicas e imunotóxicas, e por causar toxicidade nos sistemas endócrino e reprodutor humano (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2012). Entretanto, após o

estabelecimento da cultura e a infestação da área pelo nematoide, o controle químico infelizmente representa a possibilidade economicamente mais viável para reduzir as perdas causadas pelos fitonematoides (KARSSSEN, 2002; SASSER; CARTER, 1985).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro**. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/agrotoxico+utilizado+como+chumbinho+e+retirado+do+mercado+brasileiro>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

ARANTES, N. E. et al. **Cultivares de soja**: Minas Gerais e Região Central do Brasil: safra 2010/2011. Londrina: Embrapa Soja, 2010.

ASMUS, G. L.; ANDRADE, P. J. M. Reação de cultivares de soja recomendadas para o estado do Mato Grosso do Sul a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 74-79, 1996.

BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. **Plant and Nematode Interactions**. Madison: ASA, CSSA, SSA, 1998.

BIRD, D. M.; OPPERMAN, C. H.; WILLIAMSON, V. M. Plant infection by root-knot nematode. In: BERG, R. H.; TAYLOR, C. G. (Ed.). **Cell biology of plant nematode parasitism**. Berlin: Springer, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Mapa registra 16 novas marcas de agrotóxicos biológicos**. 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2013/03/maparegistra16novasmarcasdeagrotoxicosbiologicos>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

CAMPOS, V. A. C. et al. Changes in metabolites in plant roots after inoculation with *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leiden, v. 14, n. 5, p. 579-588, 2012.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-49, 2002.

CORDEIRO, M. J. Z.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117.

DALL'AGNOL, A.; ANTONIO, H.; BARRETO, J. N. Reação de 850 genótipos de soja aos nematoides de galha *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 8, p. 67-112, 1984.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; MOLINA, R. O.; COSTA, A. T. Nematóides causadores de doenças em frutíferas. **Agro@mbiente On-line**, Boa Vista, v. 2, n. 1, 2008.

DIAS, W. P. et al. **Nematoides em soja: identificação e controle**. Londrina: Embrapa, 2010. (Circular Técnica).

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução a nematologia**. 3. ed.. Viçosa, MG: UFV, 2006. 83 p.

HUANG, J. S.; BARKER, K. R. Glyceollin I in Soybean-Cyst Nematode Interactions. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, p. 1302-1307, 1991.

HUGOT, J.; BAUJARD, P.; MORAND, S. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 199-208, 2001.

JAHEN, A.; MENDES, M. L.; SILVA, M. F. A. Nematoides fitoparasitos associados à cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merr., no Vale do Paranapanema, SP. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 79-81, 1998.

KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T.; THOMASON, I. J. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean. Incompatibility to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 16, n. 3, p. 319-325, 1980.

KARSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY R. L.; MOENS, M. **Plant Nematology**. Cambridge: CABI North America Office, 2006. p. 59-90.

KARSSSEN, G. **The plant-parasitic nematode Genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe**. Boston: Brill Academic, 2002.

LAMBERTI, F. C. E.; TAYLOR, E. D. S. Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species). New York: Academic, 1979.

LEY, P. D. Lost in Worm Space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. **Nematology**, Leiden, v. 2, n. 1, p. 9-16, 2000.

LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1981. 314 p.

MANZANILLA-LÓPEZ, R. H. et al. Contributions by Latin American nematologists to the study of nematode plant disorders and related impact on crop production. In: WEBSTER, J. M.; ERIKSSON, J. M.; MCNAMARA, K. B. (Ed.). **An anecdotal history of nematology**. Moscow: Pensoft, 2008. p. 191-218.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and importante plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI North America Office, 2009. p. 1-17.

MOLINARI, S. **Bioassays on plant: nematode interaction**. Bari: Institute of Plant Protection, 2009. 1354 p.

NASU, E. G. C. et al. Efeito da manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios *in vitro* e em tomateiros em casa de vegetação. **Tropical plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 32-36, 2010.

OLIVEIRA, D. F. et al. Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their *in silico* interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 525-538, 2014.

PARLEVLIET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 7-15, 1997.

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. Root-knot nematodes. In: EISENBACK, J. D.; HUNT, D. J. **General morphology**. Virginia: CABI International, 2009. p. 18-54.

SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced Treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University, 1985.

STARR, J. L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Plant resistance to parasitic nematodes. Cambridge: CABI, 2002.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2000.

VIAENE, N. M. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as cover crop. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 945-952, 1998.

ZACHEO, G. "Introduction". In: KHAN, W. W. (Ed.). **"Nematode Interactions"**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 1-25.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Substâncias análogas da diidrouracila e 9H-purina reduzem a população de *Meloidogyne incognita* em tomateiros

RESUMO

Em decorrência dos enormes prejuízos causados aos agricultores pelos nematoides de galhas e das deficiências dos métodos existentes para o controle desses fitoparasitas, no presente trabalho foram investigadas as atividades nematicidas *in vitro* de 35 substâncias análogas da diidrouracila e 9H-purina, que se mostraram ativas contra *Meloidogyne exigua* em trabalho anterior. Dentre as substâncias estudadas, observou-se que ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**), ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**), ácido orótico (**14**), cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**), pirazinocarboxilato de metila (**17**) e 2,4-diaminopirimidina (**13**) apresentavam, respectivamente, os seguintes valores de concentração letal para 50 % de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (CL₅₀): $(8,5 \pm 1,9) \times 10^{-1}$, $2,8 \pm 1,4 \times 10^{-1}$, $1,3 \pm 6,9 \times 10^{-2}$, $(3,2 \pm 0,4) \times 10^{-1}$, $(5,5 \pm 0,4) \times 10^{-1}$ e $3,5 \pm 3,9 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL}$. Nas mesmas condições, o nematicida comercial carbofuran (N-metilcarbamato de 2,3-diidro-2,2-dimetil-1-benzofuran-7-ila) apresentou CL₅₀ de $(7,0 \pm 0,1) \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL}$. Quando submetidas a teste com mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara) inoculadas com *M. incognita*, as substâncias que mais se assemelharam ao nematicida comercial carbofuran foram **13**, **35** e **16**, que reduziram o número de ovos a valores que correspondiam, respectivamente, a 52, 51 e 26% do observado para o controle negativo, que correspondeu ao veículo empregado para dissolver as amostras. Quanto ao número de galhas, foi respectivamente reduzido a 55, 19 e 31% do observado para o controle negativo. Assim, pode-se concluir que **13**, **35** e **16** são substâncias altamente promissoras para o controle da população de *M. incognita* em tomateiros.

Palavras-chave: Nematoides de galhas. Atividade nematicida. Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. 2,4-diaminopirimidina. Ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico.

ABSTRACT

Due to the huge losses caused by plant-parasitic nematodes to farmers, and to the deficiencies of existing methods for controlling these parasites, in this study *in vitro* assays were carried out using 35 substances with similar chemical structures to dihydrouracil and 9H-purine, which proved active against *Meloidogyne exigua* in a previous work. Among the substances studied, 2-pyrazinecarboxylic acid (**15**), 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid (**16**), orotic acid (**14**), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (**35**), methyl pyrazinecarboxylate (**17**), and 2,4-diaminopyrimidine (**13**) showed, respectively, the following lethal concentration to 50% of the second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* (LC₅₀): $(8,5\pm 1,9)\times 10^{-1}$, $2,8\pm 1,4 \times 10^{-1}$, $1,3\pm 6,9 \times 10^{-2}$, $(3,2\pm 0,4)\times 10^{-1}$, $(5,5\pm 0,4)\times 10^{-1}$ e $3,5\pm 3,9 \times 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$. In similar condition, LC₅₀ for the commercial nematicide carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methylcarbamate) was $(7,0\pm 0,1)\times 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$. When subjected to an assay with tomato (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara) plants inoculated with *M. incognita*, substances that most resembled carbofuran were **13**, **35** and **16**, which reduced the numbers of nematode eggs to values corresponding, respectively, to 52, 51 and 26%, of that observed for the negative control, which was the vehicle used to dissolve the samples. The numbers of galls were respectively reduced to 55, 19 and 31% of that observed for the negative control. Thus, **13**, **35** and **16** are very promising substances to control *M. incognita* in tomato plants.

Keywords: Root-knot nematodes. Nematicidal activity. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. 2,4-diaminopyrimidine. 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides fitoparasitas podem causar um prejuízo mundial superior a US\$100 bilhões nas colheitas anuais e, dependendo da cultura e de sua localização, as perdas causadas pelos nematoides parasitas de plantas podem variar de 35 a 90% da produção agrícola (BIRD; OPPERMAN; WILLIAMSON, 2009; MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2008). Dentre as espécies mais danosas, encontram-se os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), que podem ser encontrados em todas as regiões cultiváveis do mundo, o que se atribui ao fato de possuírem ampla adaptação a diferentes ambientes, apresentarem variabilidade fisiológica e, em geral, possuírem elevado número de plantas hospedeiras (BARKER; PEDERSON; WINDHAM, 1998; KARSSSEN, 2002; LAMBERTI; TAYLOR, 1979; SASSER; CARTER, 1985). Como os métodos atualmente disponíveis para o controle desses nematoides apresentam várias deficiências, é constante a busca por novos métodos e/ou produtos para o controle de tais fitoparasitas que sejam de baixo custo e que não contaminem o homem e o ambiente com substâncias de elevada toxicidade (CHITWOOD, 2002).

Conseqüentemente, em trabalho anterior, realizado com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides (OLIVEIRA et al., 2014), observou-se que uracila, diidrouracila e 9H-purina, produzidas pelas bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, eram ativas contra o nematoide *Meloidogyne exigua*. No caso específico da diidrouracila, a concentração letal para 50% (CL₅₀) dos juvenis do segundo estágio de *M. exigua* era de 204µg/mL, enquanto para o nematicida comercial carbofuran (N-metilcarbamato de 2,3-diidro-2,2-dimetil-1-benzofuran-7-ila) o valor de CL₅₀ nas mesmas condições era de 260µg/mL. Aparentemente, tais

substâncias agem contra o nematoide através da inibição da enzima fosforibosiltransferase, que se trata de uma enzima de grande importância para a sobrevivência de nematoides. Com base em tais resultados, objetivou-se no presente estudo averiguar a atividade *in vitro* da diidrouacila e de análogos desta substância e da 9H-purina, sobre J2 de *Meloidogyne incognita*, que se trata de um nematoide de distribuição muito mais ampla e que ataca um número bem maior de plantas cultivadas do que *M. exigua* (CAMPOS, 2014). Em seguida, as substâncias mais ativas contra *M. incognita* foram submetidas a testes com mudas de tomateiro infectadas com o nematoide, com vistas a selecionar aquelas com potencial para uso futuro na formulação de produtos comerciais para o controle de nematoides fitoparasitas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias orgânicas estudadas

As substâncias empregadas foram adquiridas de fontes comerciais e utilizadas conforme recebidas, sem qualquer tratamento prévio. Foram estudados 19 análogos de diidrouracila (Figura 1) e 16 análogos de 9*H*-purina (Figura 2).

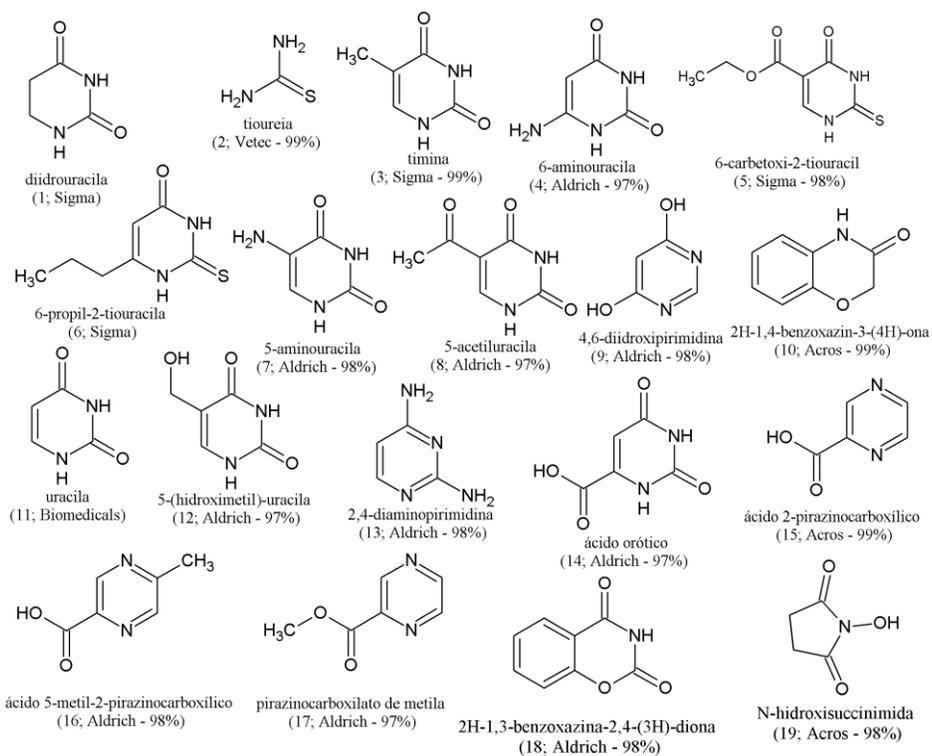


Figura 1 Estruturas químicas, nomes, códigos, fornecedores e purezas da diidrouracila e de seus análogos

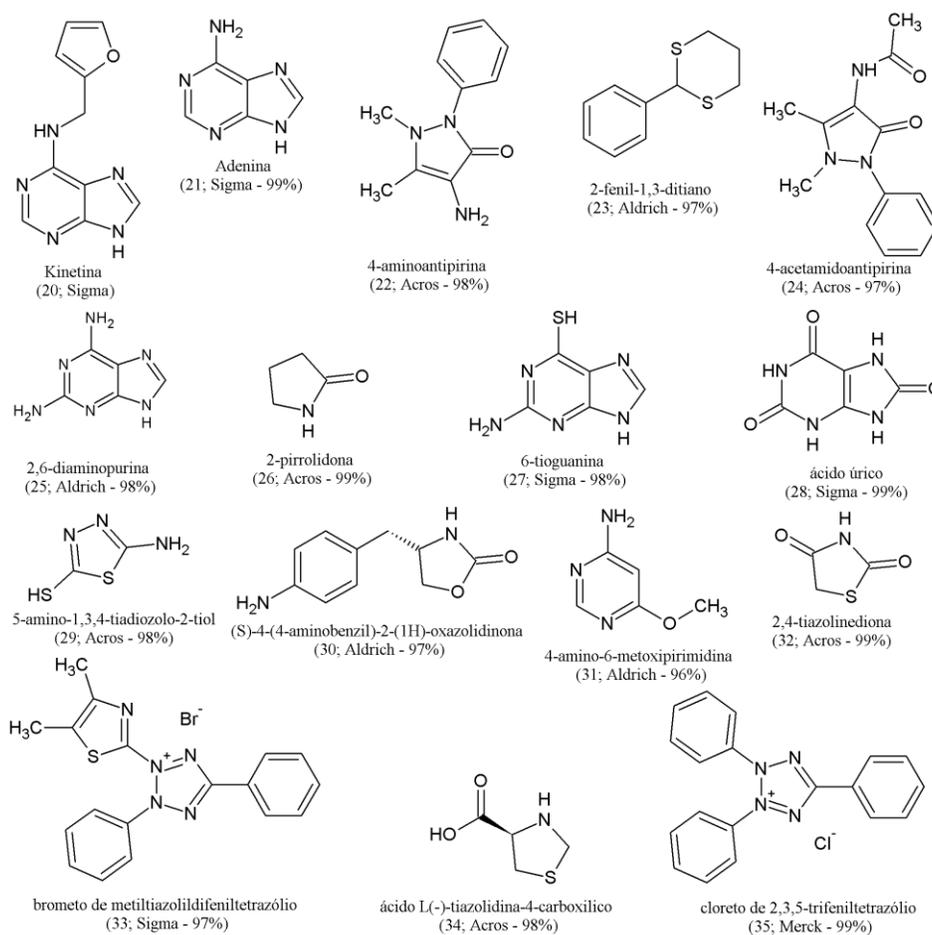


Figura 2 Estruturas químicas, nomes, códigos, fornecedores e purezas das substâncias análogas da 9H-purina

2.2 Obtenção do inóculo do nematoide

Raízes de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara) infectadas com *M. incognita* raça 3, mantidas em casa de vegetação, foram submetidas à extração de ovos pelo emprego da técnica de Hussey e Barker

(1973). Em seguida os ovos foram lavados com água sobre peneira de 25 μm (500 mesh ASTM), para serem colocados em câmara de eclosão formada por uma peneira de 500 mesh, em funil, ao qual foi acoplada mangueira, pela qual foram retirados os J2 do nematoide. Os J2 foram coletados em intervalos de 24 horas, sendo descartados aqueles da primeira coleta. Para as realizações dos testes biológicos, utilizaram-se apenas os J2 coletados no mesmo dia e/ou no dia anterior ao da montagem do teste.

2.3 Teste *in vitro* com J2 de *Meloidogyne incognita*

Em cavidades de 300 μL de placas de polipropileno contendo 96 cavidades foram colocados 20 μL de suspensão contendo aproximadamente 20 J2 de *M. incognita* e 100 μL da substância a ser testada (Figura 1), que foi previamente dissolvida em solução aquosa de Tween 80[®] a 0,01g/L, até a concentração de 5,4 $\mu\text{mol/mL}$. Após 48 horas, a 28 °C, foi realizada a avaliação de motilidade e mortalidade, conforme metodologia descrita por Amaral, Oliveira e Oliveira (2003). Fundamentalmente, contaram-se os J2 móveis e imóveis e, logo em seguida, uma a duas gotas de NaOH 1,0 mol/L recém-preparado foi adicionado a cada cavidade. Imediatamente após tal adição nova contagem foi realizada, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis, e vivos os retorcidos. Foram empregadas cinco repetições e, como testemunha positiva, foi utilizada solução aquosa de carbofuran (Aldrich, 98%) a $9,04 \times 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$. As testemunhas negativas utilizadas foram água e o veículo para a dissolução das amostras (Tween 80[®] a 0,01g/mL). Os dados foram convertidos em percentagem e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott e Knott (1974) a 5%. Para tanto, empregou-se o programa computacional SISVAR 5.3 (Sistema para análises

Estatísticas, UFLA, Lavras, 2006). Aquelas substâncias que acarretaram percentagens de J2 mortos acima de 60 %, bem como o carbofuran, foram novamente avaliadas em cinco diferentes concentrações com vistas a determinar as correspondentes concentrações letais para 50% dos J2 (CL_{50}). Para a substância 2,4-diaminopirimidina (**13**), foram empregadas soluções com as seguintes concentrações: 1,5, 3,0, 4,5, 6,1 e 7,6 $\mu\text{mol/mL}$. Para o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**) foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações: $1,1 \times 10^{-1}$, $1,9 \times 10^{-1}$, $2,8 \times 10^{-1}$, $3,6 \times 10^{-1}$ e $4,5 \times 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$. Para o ácido orótico (**14**) foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações: $9,6 \times 10^{-1}$, 1,9, 2,9, 3,8 e 4,8 $\mu\text{mol/mL}$. Para o ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**) foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações: $3,5 \times 10^{-1}$, $5,7 \times 10^{-1}$, $7,9 \times 10^{-1}$, 1,0 e 1,2 $\mu\text{mol/mL}$. Para o ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**), foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações: 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 e 6,0 $\mu\text{mol/mL}$. Para o pirazinocarboxilato de metila (**17**) foram utilizadas soluções com as seguintes concentrações: $1,5 \times 10^{-1}$, $3,1 \times 10^{-1}$, $4,6 \times 10^{-1}$, $6,2 \times 10^{-1}$ e $7,7 \times 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$. Para a obtenção do valor correspondente a zero de concentração foi empregada solução aquosa de Tween 80[®] a 0,01 g/mL no caso das substâncias estudadas e água para o carbofuran. Ao final, os valores obtidos para cada substância foram submetidos à análise de logit com o pacote drc (RITZ; STREIBIG, 2005) do programa computacional R versão 3.1.0 (R CORE TEAM, 2014).

2.4 Efeito das substâncias orgânicas sobre *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro

Utilizaram-se no presente teste apenas as substâncias que apresentaram os menores valores de CL_{50} . Todas foram dissolvidas em Tween 80[®] a 0,01g/mL

até concentrações iguais a $CL_{50} \times (C_{carb}/CL_{50}$ do carbofuran), sendo C_{carb} igual à concentração da solução de carbofuran utilizada no presente experimento. As substâncias empregadas foram: 2,4-diaminopirimidina (**13**; 9,7 $\mu\text{mol/mL}$), cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**; $7,0 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL}$), ácido orótico (**14**; 3,5 $\mu\text{mol/mL}$), ácido 2-pirazinocarboxílico (**5**; 2,4 $\mu\text{mol/mL}$), ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**; 7,6 $\mu\text{mol/mL}$) e pirazinocarboxilato de metila (**17**; 1,5 $\mu\text{mol/mL}$). Quanto ao carbofuran (controle positivo), foi utilizado na concentração de 1,9 $\mu\text{mol/mL}$. No que diz respeito ao controle negativo, foi utilizado o Tween 80[®] a 0,01g/mL.

Em bandejas de isopor de 72 células cônicas, com largura de 4 cm, profundidade de 7,5 cm, e volume de 50 cm^3 , contendo substrato agrícola (Tropstrato[®] HA hortaliças), foram semeadas alternadamente sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara). Passados sete a quinze dias fizeram-se desbastes para deixar apenas uma muda por célula e se mantiveram as bandejas durante 60 dias em casa de vegetação. Durante toda a fase de preparo e de realização do experimento, as mudas foram irrigadas diariamente e, aproximadamente a cada 15 dias foi aplicado o fertilizante Biofert Universal (Biokits) nas folhas e também no substrato. Sempre que necessário, aplicaram-se produtos para tratar doenças fúngicas, ácaros e insetos, como o leite bovino (BETTIOL; ASTIARRAGA; LUIZ, 1999), Folicur 200 EC (Bayer) e Actara 250 WG (Syngenta). Passado o referido período, foram inoculados 400 J2 de *M. incognita* raça 3 (2,4 mL de suspensão aquosa do J2) por muda com o uso de uma micropipeta com capacidade de 5.000 μL . Para tanto, aplicou-se a referida suspensão em quatro furos com profundidade aproximada de 3 cm no substrato (0,60 mL por furo), ao redor do caule da planta, que foram feitos com o uso de um bastão de vidro. As soluções das substâncias e os controles (2,0 mL) foram aplicados logo em seguida, através dos mesmos furos, sendo 0,50 mL por furo.

Nas primeiras 48 horas após a inoculação do J2, as mudas foram deixadas em câmara mantida a 24 ± 1 °C e umidade de $70\pm 10\%$. Em seguida, foram novamente mantidas em casa de vegetação durante 40 dias. Findo tal período de tempo, as raízes das mudas foram removidas das bandejas, lavadas para retirar o excesso de substrato e conservadas em sacos plásticos identificados em câmara fria (10 °C). Posteriormente, foram submetidas à contagem de galhas e extração de ovos de acordo com Hussey e Barker (1973). Os ovos foram contados em suspensão aquosa de 50 mL, com uso de microscópio óptico. Os resultados obtidos, bem como os resultados da divisão dos números de ovos e de galhas pelas massas das raízes, foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott e Knott (1974) a 5%. Para tanto, empregou-se o programa computacional SISVAR 5.3 (Sistema para análises Estatísticas, UFLA, Lavras, 2006). O experimento foi realizado duas vezes, resultando em valores semelhantes. Conseqüentemente, apenas os resultados de um dos experimentos serão apresentados neste trabalho.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito nematicida *in vitro* das substâncias orgânicas

Em geral, os análogos da diidrouracila foram mais tóxicos a *M. incognita* no teste *in vitro* que os análogos da 9*H*-purina (Tabela 1). Dentre todas as substâncias estudadas, apenas o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**), ácido orótico (**14**), ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**) e ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**), apresentaram valores de J2 mortos que não diferiam estatisticamente do observado para o carbofuran, sendo a primeira substância (**35**) um análogo da 9*H*-purina, enquanto as demais são análogas da diidrouracila.

As substâncias mais ativas contra o nematoide no teste *in vitro* (Tabela 1) apresentaram os seguintes valores de CL_{50} : $3,5 \pm 3,9 \times 10^{-1}$ (2,4-diaminopirimidina, **13**), $(3,2 \pm 0,4) \times 10^{-1}$ (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, **35**), $1,3 \pm 6,9 \times 10^{-2}$ (ácido orótico, **14**), $(8,5 \pm 1,9) \times 10^{-1}$ (ácido 2-pirazinocarboxílico, **15**), $2,8 \pm 1,4 \times 10^{-1}$ (ácido 5-metil-2-pirazino carboxílico, **16**), $(5,5 \pm 0,4) \times 10^{-1}$ (pirazino carboxilato de metila, **17**) $\mu\text{mol/mL}$. Vale chamar a atenção para o fato das substâncias **35**, **15** e **17** terem sido mais ativas que o nematicida comercial carbofuran, cuja CL_{50} foi de $(7,0 \pm 0,1) \times 10^{-1}$ $\mu\text{mol/mL}$ nas mesmas condições empregadas para as substâncias estudadas.

Tabela 1 Efeitos das substâncias sobre a motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Substância ¹	J2 imóveis (%) ²	J2 mortos (%) ²	OBS ³
diidrouracila (1)	44,2 c	37,5 b	D
tioureia (2)	15,7 a	15,7 a	D
timina (3)	17,6 a	17,6 a	D
6-aminouracila (4)	22,2 a	17,8 a	D
6-carboxi-2-tioureia (5)	22,9 a	19,8 a	D
6-propil-2-tiouracila (6)	25,0 a	22,2 a	D
5-aminouracila (7)	29,3 a	27,8 b	D
5-acetiluracila (8)	33,7 b	28,2 b	D
4,6-diidroxipirimidina (9)	37,2 b	28,7 b	D
2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (10)	26,7 a	24,7 a	D
uracila (11)	42,2 b	36,6 b	D
5-(hidroximetil)uracila (12)	35,9 b	23,0 a	D
2,4-diaminopirimidina (13)	66,3 d	64,6 c	D
ácido orótico (14)	90,1 e	88,5 d	D
ácido 2-pirazinocarboxílico (15)	98,8 e	91,9 d	D
ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (16)	92,7 e	89,3 d	D
pirazinocarboxilato de metila (17)	71,4 d	68,5 c	D
2H-1,3-benzoxazina-2,4-(3H)-diona (18)	27,0 a	21,7 a	D
N-hidroxisuccinimida (19)	51,3 c	40,4 b	D
kinetina (20)	10,5 a	10,5 a	P
adenina (21)	33,6 b	16,5 a	P
4-aminoantipirina (22)	33,0 b	31,7 b	P
2-fenil-1,3-ditiano (23)	35,0 b	28,3 b	P
4-acetamidoantipirina (24)	29,6 a	20,7 a	P
2,6-diaminopurina (25)	28,2 a	22,6 a	P
2-pirrolidona (26)	10,7 a	10,7 a	P

Tabela 1, conclusão

Substância ¹	J2 imóveis (%) ²	J2 mortos (%) ²	OBS ³
6-tioguanina (27)	28,1 a	16,9 a	P
ácido úrico (28)	28,5 a	28,5 b	P
5-amino-1,3,4-tiadiazolo-2-tiol (29)	52,0 c	42,2 b	P
(S)-4-(4-aminobenzil)-2-(1H)-oxazolidinona (30)	34,4 b	30,7 b	P
4-amino-6-metoxipirimidina (31)	11,0 a	9,5 a	P
2,4-tiazolinadiona (32)	70,3 d	53,8 c	P
brometo de metiltiazolidifeniltetrazólio (33)	36,1 b	34,2 b	P
ácido L(-)-tiazolidina-4-carboxílico (34)	53,0 c	46,3 b	P
cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (35)	90,7 e	81,8 d	P
carbofuran ⁴ (controle positivo)	96,7 e	92,8 d	
água (controle negativo)	20,9 a	14,8 a	
Tween 80 [®] (controle negativo)	22,0 a	16,5 a	

¹ As substâncias estavam na concentração de 5,4 µmol/mL

² Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não podem ser diferenciadas entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

³ Em que D representa os derivados de diidrouacila e P os derivados de 9H-purina.

⁴ Concentração de $9,04 \times 10^{-1}$ µmol/mL

3.2 Efeitos das substâncias orgânicas sobre a população de *Meloidogyne incognita*

Quando se leva em consideração o número de ovos por planta, observa-se que todas as substâncias testadas reduziram a população do nematoide nas plantas de tomateiro quando comparadas ao controle negativo, que correspondeu à solução aquosa de Tween 80[®]. Ao se passar para o parâmetro número de galhas por planta, apenas a substância **14** acarretou a obtenção de valor que não diferiu significativamente do observado para o controle negativo (Figura 3).

Vale mencionar que as massas das raízes das plantas expostas ao Tween 80[®] (controle negativo) foram significativamente maiores que as observadas para os outros tratamentos. As menores massas ocorreram para as plantas tratadas com **15**, enquanto todos os outros tratamentos apresentaram valores intermediários. Quando os números de galhas por planta foram divididos pelas massas dos sistemas radiculares, observou-se que apenas as plantas tratadas com **16** apresentavam valores que não diferenciavam significativamente dos valores obtidos para o nematicida carbofuran. Ao se fazer o mesmo com os números de ovos por planta, verificou-se que as plantas tratadas com **13**, **35**, **16** e **17** resultavam em valores que também não diferenciavam significativamente do carbofuran.

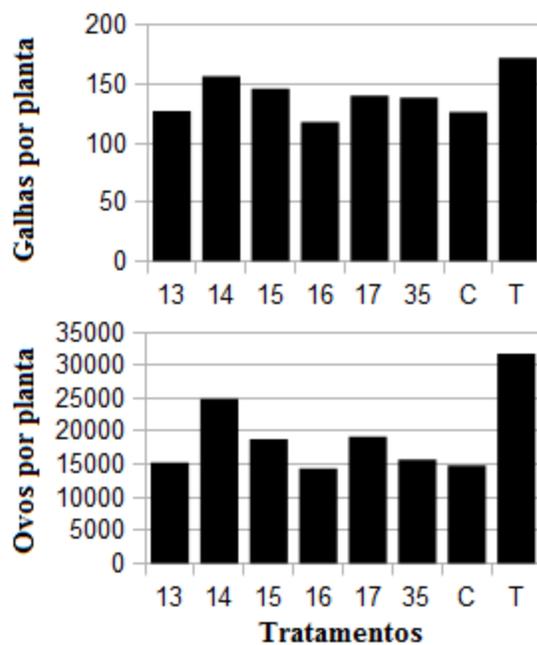


Figura 3 Efeitos das substâncias orgânicas sobre a população de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. Barras com a mesma letra, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$). **13**: 2,4-diaminopirimidina ($9,7 \mu\text{mol/mL}$); **14**: ácido orótico ($3,5 \mu\text{mol/mL}$); **15**: ácido 2-pirazinocarboxílico ($2,4 \mu\text{mol/mL}$); **16**: ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico ($7,6 \mu\text{mol/mL}$); **17**: pirazinocarboxilato de metila ($1,5 \mu\text{mol/mL}$); **35**: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ($7,0 \times 10^{-1} \mu\text{mol/mL}$); **C**: carbofuran ($1,9 \mu\text{mol/mL}$); **T**: Tween 80 a $0,01 \text{ g/mL}$

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, quando na concentração de 5,4 $\mu\text{mol/mL}$, a diidrouracila causou 37,5 % de mortalidade de J2 de *M. incognita* (Tabela 1), enquanto em trabalho anterior, na concentração de 4,4 $\mu\text{mol/mL}$, elevou a mortalidade de J2 de *M. exigua* para 100% (OLIVEIRA et al., 2014). Além disto, verifica-se claramente que a atividade nematicida da diidrouracila no presente trabalho é bem inferior a observada para o carbofuran (Tabela 1). Em outras palavras, a diidrouracila é bem mais ativa contra *M. exigua* do que contra *M. incognita*. Situação similar foi observada para a 9H-purina que, em testes *in vitro* preliminarmente realizados contra *M. incognita*, em trabalho ainda não publicado, apresentou menor atividade nematicida que a relatada contra *M. exigua* (OLIVEIRA et al., 2014). Diante de tais resultados, alterações nas estruturas químicas da diidrouracila e da 9H-purina foram necessárias para se conseguir substâncias com maiores atividades nematicidas contra *M. incognita*.

No grupo da diidrouracila e análogos, observa-se que uracila (**11**) tem fraca atividade nematicida (Tabela 1). Entretanto, a conexão de uma carboxila ao anel, formando o ácido orótico (**14**), faz com que a atividade aumente significativamente. É interessante observar que as remoções dos átomos de oxigênio e a mudança de posição de um dos átomos de nitrogênio, o que gerou o ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**), não alterou significativamente a atividade nematicida contra *M. incognita*. Logo, parece que a existência de um anel aromático ligado a uma carboxila que tenha um átomo de nitrogênio em carbono vizinho é de grande importância para maximizar a atividade nematicida. Tanto é assim, que quando a carboxila de **15** foi protegida na forma de um éster metílico, gerando o pirazinocarboxilato de metila (**17**), a atividade nematicida caiu significativamente. Ademais, segundo dados da literatura, a pirazina, que

corresponde a **15** sem a carboxila, apresentou atividade nematicida muito baixa frente a *M. incognita* (WEN et al., 2015). Segundo os autores, tal comportamento também foi observado para 2,6-dimetilpirazina, trimetilpirazina e 2-metilpirazina, o que está de acordo com a necessidade de uma carboxila ligada ao anel aromático da pirazina para que a atividade nematicida seja maximizada.

Dentre as substâncias análogas da diidrouacila, também vale mencionar que as fracas atividades nematicidas de 2H-1,4-Benzoxazin-3-(4H)-ona (**10**) e 2H-1,3-benzoxazina-2,4-(3H)-diona (**18**), no presente trabalho (Tabela 1), parecem de acordo com a baixa eficiência de **10** contra o mesmo nematoide no solo (MEYER; RICE; ZASADA, 2009).

Quanto aos análogos da 9H-purina, o grande destaque foi o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**), que se mostrou bastante ativo no teste *in vitro* (Tabela 1). Havia um relato de atividade nematicida para esta substância na literatura (SILVA et al., 2009), o que corrobora os resultados aqui descritos. Além disso, o seu poder biocida, quando em elevadas concentrações, era conhecido (HURWITZ; MC CARTHY, 1986; MUSTAKALLIO; AHOS, 1955). Ainda um estudo com substâncias análogas ao tetrazol revelou potente atividade nematicida deste grupo frente a um amplo espectro de nematoides parasitas de plantas e de animais, sendo nesses administrada por via oral e tópica (CRAWFORD et al., 2012). Também foi relatada a sua atividade fitotóxica contra alface e soja, embora isso tenha ocorrido em concentração próxima de 80 vezes aquelas que foram empregadas no presente trabalho (SILVA et al., 2009).

Quando os valores de CL₅₀ foram calculados para as substâncias mais ativas no teste *in vitro* (Tabela 1), observou-se que eram bem próximos do obtido para o carbofuran, sendo vários deles menores que os observados para tal nematicida. Especificamente para **35**, a CL₅₀ foi próxima daquela relatada contra

M. incognita e *M. exigua* (SILVA et al., 2009). Logo, todas as substâncias selecionadas no teste *in vitro* se mostraram potencialmente úteis para o controle de *M. incognita*.

Em geral, os resultados do teste *in vitro* estão condizentes com os valores observados para o teste realizado com mudas de tomateiros, já que, a exceção da substância **14**, todas as outras reduziram o número de galhas nas raízes das plantas a valores que não diferiam estatisticamente do obtido para as plantas tratadas com o carbofuran (Figura 2). Esse é um resultado bastante promissor, especialmente para as substâncias **35**, **15** e **17** ($4,7 \times 10^{-1}$, $6,0 \times 10^{-1}$ e $4,1 \times 10^{-1}$ mg de cada substância, respectivamente, por planta), que foram utilizadas em menores quantidades que o carbofuran ($8,4 \times 10^{-1}$ mg por planta). Embora o comportamento geral tenha sido parecido quando se levou em consideração o número de ovos por planta, verifica-se para as substâncias **15** e **17**, que este parâmetro não se correlaciona totalmente com o número de galhas por planta. Quando se leva em consideração ambos os parâmetros (número de galhas e de ovos por planta) o destaque fica para a substância **35**, que acarretou a obtenção de valores que não diferiam estatisticamente do carbofuran (Figura 2).

Quanto à toxicidade desses compostos observou-se que um derivado do 2,4-diaminopirimidina (**13**), o aditoprím, que possui efeito bacteriostático, não causou malformação externa, viscerais ou esqueléticas óbvias em fetos de ratos, não apresentando assim efeito teratogênico, efeito este observado na grande maioria dos pesticidas existentes (WANG et al., 2015). Há um derivado pirazínico, a pirazinamida, que é utilizada clinicamente no tratamento de tuberculose, o que indica seu baixo efeito tóxico ao homem (LE BOURGEOIS et al., 1989). Substâncias análogas ao tetrazol quando administrado por via oral e tópica, ou quando utilizado em plantas, não causaram significativa toxicidade aos animais e/ou fitotoxicidade, mostrando atividade comparada aos padrões

comerciais e ainda segurança para organismos não alvos (CRAWFORD et al., 2012), o que pode indicar que o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**) reproduza os mesmos resultados.

Os pesticidas são a principal classe suspeita de intoxicação a animais, os carbamatos, por exemplo, como o carbofuran, usado como controle positivo no presente trabalho, foi responsável por mais de 20% dos casos de envenenamento a animais de 2000 a 2010 (CALONI; CORTINOVIS; DAVANZO, 2012). Ocorreu uma diminuição de casos de envenenamento após sua proibição na União Europeia em 2007, devido a sua alta toxicidade, baixa segurança de manipulação e efeitos ecotoxicológicos, porém, mesmo após sua proibição foi atribuído ao carbofuran e ao aldicarb a responsabilidade pela morte de 62% de animais selvagens e 74% de animais domésticos na Espanha (RUIZ-SUÁREZ et al., 2015), já no Brasil sua venda continua livre.

Quanto ao aspecto econômico, que é de fundamental importância para o desenvolvimento de um novo nematicida, observam-se os seguintes valores comerciais para 1 g das substâncias que apresentaram as maiores atividades nematicidas no presente trabalho: R\$46,00 (**35**; pureza $\geq 99,0\%$), R\$324,00 (**13**; pureza de 98%), R\$70,20 (**16**; pureza de 98%). No que diz respeito a 1 g do nematicida comercial carbofuran, com grau de pureza de 98%, tem-se um custo de R\$80,00 (SIGMA-ALDRICH, 2015). Levando-se em consideração tais valores e as concentrações utilizadas no teste *in vivo* realizado no presente trabalho, os custos com essas substâncias puras foram, respectivamente, 0,4, 10,3 e 2,2 vezes o custo de uso do carbofuran. Assim, pode-se afirmar que, além de possuírem elevadas atividades nematicidas, as substâncias **35** e **16** também apresentam viabilidade econômica. Logo, são altamente promissoras para o desenvolvimento de novos nematicidas comerciais. Porém, no comércio é fácil encontrar substâncias à base de carbofuran com baixos preços, como é o caso do

Furadan 350 SC, que apresenta 350g de carbofuran por litro. Cada litro desta substância sai por R\$27,97, e no combate de *M. incognita* em tomateiros é necessário o uso de 200L por hectare (AGROLINK, 2015), o que pode não refletir nos custos encontrados no presente trabalho, por se trabalhar com substâncias puras.

5 CONCLUSÃO

Dentre todas as substâncias análogas da diidrouacila e da 9H-purina que foram submetidas a testes *in vitro* e *in vivo* com *M. incognita* no presente trabalho, as que mais se destacaram foram: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**), que é um análogo da 9H-purina; e ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**) e 2,4-diaminopirimidina (**13**), que são análogos da diidrouacila. Essas substâncias reduziram a população de *M. incognita* em tomateiros a valores que não diferiram estatisticamente do observado para o nematicida comercial carbofuran. Logo, tais substâncias são altamente promissoras para uso no desenvolvimento de novos nematicidas comerciais. Ademais, com base nos valores comerciais dessas substâncias e do carbofuran, quando com graus de pureza iguais ou maiores do que 98%, verifica-se que os custos de uso de **35** e **16** são próximos do valor calculado para o carbofuran, o que sugere a existência de viabilidade econômica para o uso atual de **35** e **16** nas formulações de novos nematicidas comerciais.

REFERÊNCIAS

- AGROLINK. **Distribuidora de defensivos agrícolas**. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/oportunidades/AnuncioDetalhe.aspx?CodAnuncio=6094>>. Acesso em: 30 set. 2015.
- AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, F. E. R.; OLIVEIRA, D. F. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leiden, v. 5, n. 6, p. 859-864, 2003.
- BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. Madison: ASA, CSSA, SSA, 1998.
- BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D.; LUIZ, A. J. B. Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, n. 8, p. 489-492, 1999.
- BIRD, D. M.; OPPERMAN, C. H.; WILLIAMSON, V. M. Plant infection by root-knot nematode. In: BERG, R. H.; TAYLOR, C. G. (Ed.). **Cell biology of plant nematode parasitism**. Berlin: Springer. 2009.
- CALONI, F. D. V. M.; CORTINOVIS, C. D. V. M.; DAVANZO, F. M. D. Animal poisoning in Italy: 10 years of epidemiological data from the Poison Control Centre of Milan. **Veterinary Record**, London, v. 170, n. 16, p. 415, 2012.
- CAMPOS, V. A. C. **Prospecção e estudo *in silico* de metabólitos produzidos por espécies vegetais para o controle de *Meloidogyne* spp.** 2014. 164 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-49, 2002.

CRAWFORD, M. J. et al. **New compositions and methods for controlling nematode pests**. Geneva: The International Patent System, 2012.

HURWITZ, C. N.; MC CARTHY, T. J. 2,3,5-tripheniltetrazolium chloride as a novel tool in germicide dynamics. **Journal Pharmaceutical Sciences**, Malden, v. 75, n. 9, p. 912-916, 1986

HUSSEY, R. S.; BAKER, K. R. "A Comparison of Methods for Colecting Inocula of *Meloidogyne* spp. Including a New Technique". **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.

KARSSSEN, G. **The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe**. Boston: Brill Academic, 2002.

LAMBERTI, F. C. E.; TAYLOR, E. D. S. **Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species)**. New York: Academic, 1979.

LE BOURGEOIS, M. et al. Good tolerance of pyrazinamide in children with pulmonary tuberculosis. **Archives of disease in childhood**, London, v. 64, n. 1, p. 177-178, 1989.

MANZANILLA-LÓPEZ, R. H. et al. Contributions by Latin American nematologists to the study of nematode plant disorders and related impact on crop production. In: WEBSTER, J. M.; ERIKSSON, J. M.; MCNAMARA, K. B. (Ed.). **An anecdotal history of nematology**. Moscow: Pensoft, 2008. p. 191-218.

MEYER, S. L. F.; RICE, C. P.; ZASADA, I. A. DIBOA: fate in soil and effects on root-knot nematode egg numbers. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1555-1560, 2009

MUSTAKALLIO, K. K.; AHOS, E. O. Tetrazolium reduction test for milk. **Science**, Washington, v. 122, p. 971-972, 1955.

OLIVEIRA, D. F. et al. Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their *in silico* interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 525-538, 2014.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Viena, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Linz, v. 12, n. 5, p. 1-27, 2005.

RUIZ-SUÁREZ, N. et al. Continued implication of the banned pesticides carbofuran and aldicarb in the poisoning of domestic and wild animals of the Canary Islands (Spain). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 505, p. 1093-1099, 2015.

SASSER, J. N.; CARTER, C. C. An advanced Treatise on Meloidogyne. Raleigh: North Carolina State University, 1985.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 502-512, 1974.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 14 set. 2015.

SILVA, W. J. R. et al. Activities of substances organic against *Meloidogyne* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 28., / CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL, 2., 2009, Maceió. **Resumos...** Brasília: ONTA-SBN, 2009. p. 270-270.

WANG, X. et al. Two-generation reproduction and teratology studies of feeding aditoprím in Wistar rats. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 35, n. 12, p. 1531-1538, 2015.

WEN, F. et al. Synergism between urea and urease-positive bacteria in controlling root-knot nematodes. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 179-191, 2015.