

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

SUBSTÂNCIAS ANÁLOGAS DA DI-IDROURACILA E 9H-PURINA CONTROLAM *MELOIDOGYNE INCOGNITA* EM TOMATEIRO

Karina Campos Lopes¹, Willian César Terra², Eduardo Souza Freire², Iselino Nogueira Jardim³, Vicente Paulo Campos², Viviane Aparecida Costa Campos¹, e Denilson Ferreira Oliveira^{1*}

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, 37200-000, Lavras - MG- Brasil. ²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, 37200-000, Lavras - MG- Brasil. ³Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, 37200-000, Lavras - MG- Brasil. *Autor para correspondência: denilson@dqi.ufla.br

ABSTRACT

Lopes, K. C., W. C. Terra, E. S. Freire, I. N. Jardim, V. P. Campos, V. A. C. Campos, and D. F. Oliveira. 2016. Analogues of dihydrouracil and 9H-purine control *Meloidogyne incognita* in tomato plants. *Nematropica* 46:138-146.

To contribute to the development of new products to control *Meloidogyne incognita* in tomato plants, the nematicidal activities against this nematode by 35 substances with similar chemical structures to dihydrouracil and 9H-purine were investigated. Initially, the *in vitro* effect of these substances on the motility and mortality of second-stage juveniles (J2) of *M. incognita* were evaluated. The most active were 2-pyrazinecarboxylic acid, 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid, orotic acid, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, methyl pyrazinecarboxylate, and 2,4-diaminopyrimidine. The *in vitro* lethal concentrations to 50% of *M. incognita* J2 (LC₅₀) of these compounds, respectively were: 0.85 ± 0.19, 2.8 ± 0.1, 1.3 ± 0.1, 0.32 ± 0.04, 0.55 ± 0.04, and 3.5 ± 0.4 µmol/ml. Under similar conditions, the LC₅₀ for the commercial nematicide carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methylcarbamate) was 0.70 ± 0.01 µmol/ml. When the most active substances were subjected to an assay with tomato (*Solanum lycopersicon* cv. Santa Clara) plants inoculated with *M. incognita*, those that most resembled carbofuran were 2,4-diaminopyrimidine, 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid, methyl pyrazinecarboxylate, and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Thus, these analogues of dihydrouracil and 9H-purine are promising for the development of new products to control *M. incognita* in tomato plants.

Key words: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, 2,4-diaminopyrimidine, 5-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid, nematicidal activity, root-knot nematodes.

RESUMO

Lopes, K. C., W. C. Terra, E. S. Freire, I. N. Jardim, V. P. Campos, V. A. C. Campos e D. F. Oliveira. 2016. Substâncias análogas da di-idrouracila e 9H-purina controlam *Meloidogyne incognita* em tomateiro. *Nematropica* 46:138-146.

Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro, as atividades nematicidas com relação a 35 substâncias análogas da di-idrouracila e 9H-purina foram investigadas. Inicialmente, foram avaliados os efeitos *in vitro* das substâncias sobre a motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*. As mais ativas foram: 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) que apresentaram, os seguintes valores de concentração letal *in vitro* para 50% dos J2s (CL₅₀): 0,85 ± 0,19, 2,8 ± 0,1, 1,3 ± 0,1, 0,32 ± 0,04, 0,55 ± 0,04, e 3,5 ± 0,4 µmol/ml, respectivamente. Nas mesmas condições, o nematicida comercial carbofuran (N-metilcarbamatato de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-1-benzofuran-7-ila) apresentou CL₅₀ de 0,70 ± 0,01 µmol/ml. Quando as substâncias mais ativas foram submetidas a teste em mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara), inoculadas com *M. incognita*, aquelas que mais se assemelharam ao nematicida comercial carbofuran foram 13, 35, e 16. Dessa maneira, conclui-se que tais substâncias análogas da di-idrouracila e 9H-purina são promissoras para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *M. incognita* em tomateiro.

Palavras chave: 2,4-diaminopirimidina, ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico, atividade nematicida, cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, nematoide de galhas.

INTRODUÇÃO

Os fitonematoides representam fator limitante para a produção de alimentos e fibras no mundo, pois são responsáveis por acarretar redução de aproximadamente 10% da produção agrícola mundial (McCarter, 2008). Dentre as espécies mais danosas estão os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), que podem ser encontrados em todas as regiões cultiváveis do mundo (Sasser e Carter, 1985; Barker *et al.*, 1998). Uma das espécies desse gênero, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, pode ser considerado um dos patógenos de plantas que mais causa danos à agricultura (Trudgill e Block, 2001).

O tomate é a hortaliça-fruto mais produzida e consumida no Brasil. Sua cadeia produtiva tem relevância econômica no agronegócio brasileiro, pois movimentada, anualmente, mais de R\$ 2 bilhões. Em 2012 a produção nacional foi de 4 milhões de toneladas em uma área de 63 mil hectares (Agrianual, 2014). A diminuição na produtividade do tomateiro, decorrente do parasitismo de *Meloidogyne* spp, pode chegar a 44% (Charchar e Aragão, 2005).

Os métodos mais utilizados para o manejo dos fitonematoides presentes em áreas cultivadas com tomateiro são: i) cultivares resistentes, ii) rotação de cultura, iii) controle químico. Entretanto, esses métodos apresentam várias deficiências, sendo 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; Seid *et al.*, 2015).

Em trabalho anterior, conduzido pela mesma equipe deste estudo (Oliveira *et al.*, 2014), observou-se que uracila, di-idrouracila e 9H-purina, produzidas pelas bactérias *Bacillus subtilis* (Ehrensberg) Cohn e *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, foram ativas *in vitro* contra *Meloidogyne exigua* Goeldi. No caso específico da di-idrouracila, a concentração letal para 50% (CL₅₀) dos juvenis do segundo estágio (J2) foi de 204 µg/ml, enquanto para o nematocida comercial carbofuran (N-metilcarbamato de 2,3-di-idro-2,2-dimetil-1-benzofuran-7-ila) o valor de CL₅₀ nas mesmas condições foi de 260 µg/ml. De acordo com os autores, aparentemente tais substâncias agem contra o nematoide através da inibição da fosforibosiltransferase, uma enzima de grande importância para a sobrevivência dos nematoides. Com base nesses resultados, objetivou-se no presente trabalho, averiguar, *in vitro*, a atividade nematocida contra o J2 de *M. incognita*, da di-idrouracila e de análogos desta substância e da 9H-purina. Posteriormente, as substâncias mais ativas nos testes *in vitro* foram aplicadas em substrato empregado

para o cultivo de tomateiro infestado com J2 de *M. incognita*, com vistas a selecionar aquelas com potencial para uso futuro na formulação de nematocidas comerciais para emprego na cultura do tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Substâncias orgânicas estudadas

As substâncias empregadas foram adquiridas de fontes comerciais e utilizadas conforme recebidas, sem qualquer tratamento prévio. Foram estudados 19 análogos da di-idrouracila e 16 análogos da 9H-purina (Figuras 1 e 2). Além das similaridades estruturais de tais análogos com a di-idrouracila e 9H-purina, também foi critério de escolha dos mesmos as suas disponibilidades comerciais com baixo custo.

Obtenção do inóculo de Meloidogyne incognita

Populações puras de *M. incognita* foram multiplicadas em tomateiros e mantidas em casa de vegetação por três meses. A seguir, as raízes com galhas foram separadas do substrato, lavadas em água parada e cortadas em pedaços de 0,5 cm de comprimento. Delas foram extraídos ovos pelo processo descrito por Hussey e Barker (1973). Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão e os J2 eclodidos entre o segundo e terceiro dia da montagem da câmara foram utilizados nos ensaios.

Atividade nematocida in vitro das substâncias sobre Meloidogyne incognita

Em cavidades de 300 µL de placas de polipropileno contendo 96 cavidades (placas utilizadas no teste de Elisa), foram colocados 20 µL de suspensão contendo aproximadamente 20 J2 de *M. incognita*. Logo em seguida, adicionaram-se à suspensão contendo os J2, 100 µL da solução contendo a substância a ser testada, que foi previamente dissolvida em solução aquosa de Tween 80® a 0,01g/ml, até a concentração de 5,40 µmol/ml. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C no escuro. Empregaram-se cinco repetições por tratamento e, como testemunha positiva, foi utilizada solução aquosa de carbofuran (Aldrich, 98%) a 0,90 µmol/ml. As testemunhas negativas utilizadas foram água e o veículo para a dissolução das amostras, o Tween 80® a 0,01g/ml.

Após 48 horas, foi realizada a avaliação de mobilidade e mortalidade dos J2 de *M. incognita*, conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000) e adaptada por Amaral *et al.* (2003).

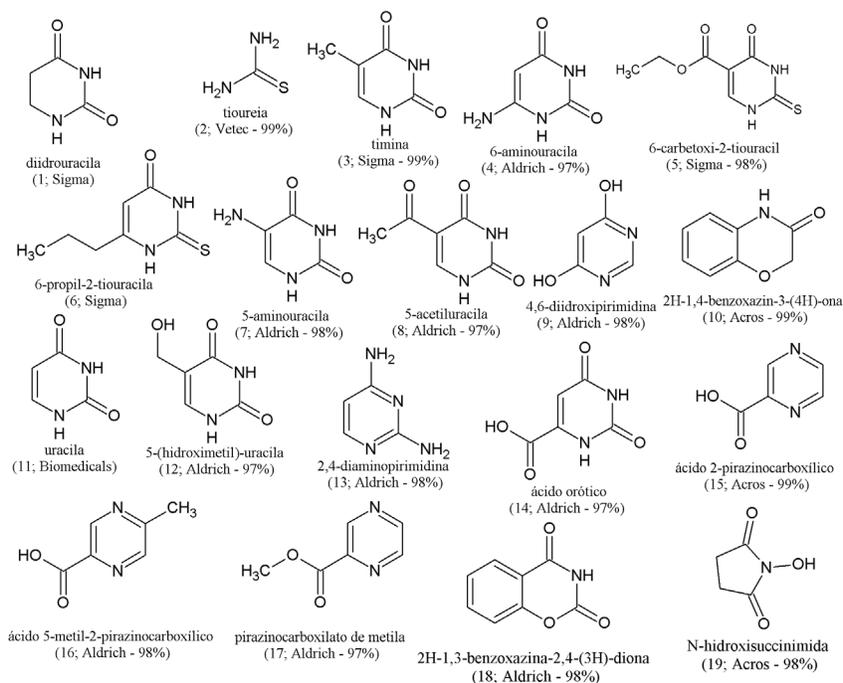


Fig. 1. Estruturas químicas, nomes, códigos, fornecedores e purezas da di-hidrouracila e de seus análogos.

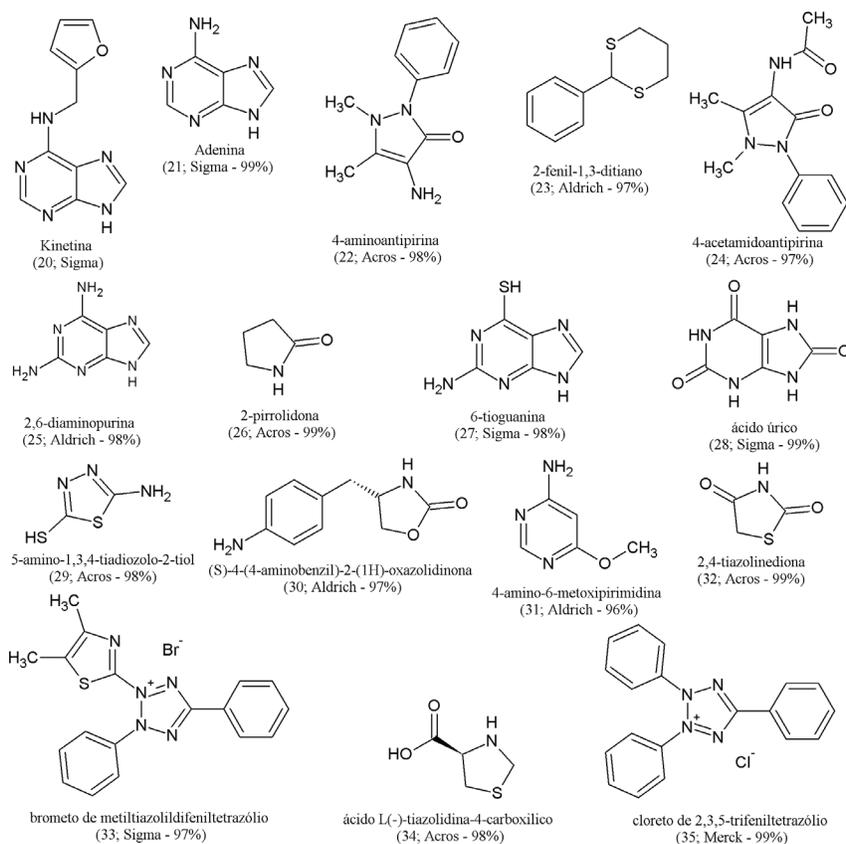


Fig. 2. Estruturas químicas, nomes, códigos, fornecedores e purezas das substâncias análogas da 9H-purina.

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 a adição do NaOH, nova contagem foi realizada, considerando-se como mortos os nematoides retos e imóveis, e vivos os móveis.

As substâncias que acarretaram percentagens de J2 mortos acima de 60%, bem como o nematocida carbofuran, foram novamente avaliadas em cinco diferentes concentrações com o objetivo de determinar as correspondentes concentrações letais para 50% dos J2 (CL_{50}). As substâncias testadas e suas respectivas concentrações foram: 2,4-diaminopirimidina (**13**) a 1,50, 3,00, 4,50, 6,10, e 7,60 $\mu\text{mol/ml}$; cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**) a 0,11, 0,19, 0,28, 0,36, e 0,45 $\mu\text{mol/ml}$; ácido orótico (**14**) a 0,96, 1,90, 2,90, 3,80, e 4,80 $\mu\text{mol/ml}$; ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**) a 0,35, 0,57, 0,79, 1,00, e 1,20 $\mu\text{mol/ml}$; ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**) a 1,20, 2,40, 3,60, 4,80, e 6,00 $\mu\text{mol/ml}$; e pirazinocarboxilato de metila (**17**) a 0,15, 0,31, 0,46, 0,62, e 0,77 $\mu\text{mol/ml}$. 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.

Aplicação das substâncias em substrato infestado com M. incognita

Utilizaram-se no presente ensaio apenas as substâncias que apresentaram os menores valores de CL_{50} . Todas elas foram dissolvidas em Tween 80® a 0,01g/ml até concentrações iguais a $CL_{50} \times (C_{\text{carb}}/CL_{50} \text{ do carbofuran})$, sendo C_{carb} igual à concentração da solução de carbofuran utilizada no presente experimento, que foi de 1,9 $\mu\text{mol/ml}$. Tal valor foi escolhido com base em experimentos previamente realizados para determinar a concentração mais adequada do carbofuran. 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 (**15**; 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 $\mu\text{mol/ml}$). Como controle negativo se utilizou Tween 80® a 0,01g/ml.

Em bandejas de isopor de 72 células preenchidas com substrato agrícola (Tropstrato® HA hortaliças), foram semeadas alternadamente sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) de forma a ocupar apenas 36 células. Decorridos 15

dias, realizou-se o desbaste deixando uma plântula por célula. Durante a realização do experimento, as mudas foram irrigadas diariamente e fertilizadas a cada 15 dias pela aplicação de Biofert Universal® (Biokits). Sessenta dias após a semeadura, com o uso de micropipeta automática, foram inoculados aproximadamente 400 J2 de *M. incognita* (2,4 ml de suspensão aquosa do J2) por planta, através de quatro furos com profundidade aproximada de 3 cm no substrato (0,60 ml por furo), ao redor do caule da planta. As soluções das substâncias e controles (2,0 ml cada) foram aplicadas logo em seguida, através dos mesmos furos nos substratos, sendo 0,50 ml por furo. Nas primeiras 48 horas após a inoculação dos J2, as mudas foram mantidas em câmara de crescimento a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com umidade de $70 \pm 10\%$. Em seguida, as bandejas foram levadas para a casa de vegetação. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por 40 dias. A seguir, a parte aérea foi cortada e descartada. As raízes foram separadas do substrato em água parada e cuidadosamente lavadas para evitar perdas de raízes finas. O excesso de água foi eliminado colocando as raízes sobre papel toalha por 20 minutos. Então, as raízes foram pesadas, cortadas em pedaços de 0,5 cm de comprimento, colocadas em liquidificador com hipoclorito de sódio a 0,5% e trituradas. Os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey e Barker (1973) e quantificados em microscópio, para o cálculo do número de ovos por massa de sistema radicular. O experimento foi realizado duas vezes, resultando em valores semelhantes. Consequentemente, apenas os resultados de um dos experimentos são apresentados neste trabalho.

Análise dos dados e estatística

Os dados obtidos nos testes *in vitro* foram convertidos em percentagens e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas entre si 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). Para determinar a CL_{50} , após conversão dos dados experimentais em percentagens, os valores foram submetidos à análise de logit com o pacote drc (Ritz e Streibig, 2005) do programa computacional R versão 3.1.0 (R Core Team, 2014). Os valores obtidos no teste *in vivo* foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott e Knott (1974) a 5%, empregando-se também o programa computacional SISVAR 5.3 (Sistema para análises Estatísticas, UFLA, Lavras, 2006).

RESULTADOS

Atividade nematicida *in vitro* das substâncias sobre *Meloidogyne incognita*

Em geral, os análogos da di-idrouracila foram mais tóxicos a *M. incognita* no teste *in vitro* que os análogos da 9H-purina, causando imobilidade e mortalidade dos J2 do nematoide (Tabela 1). Dentre os tratamentos testados, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (35), ácido orótico (14), ácido 2-pirazinocarboxílico (15) e ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (16), foram as substâncias que causaram as maiores mortalidades do nematoide, não diferindo estatisticamente ($p < 0,001$) do controle positivo carbofuran. A substância (35) é um análogo da 9H-purina, enquanto as demais

são análogas da di-idrouracila. As substâncias 2,4-diaminopirimidina (13), pirazinocarboxilato de metila (17), e 2,4-tiazolinadiona (32) causaram mortalidade acima de 64%. Várias outras substâncias causaram imobilidade e mortalidade dos nematoides significativamente maiores que as observadas para os controles negativos água e Tween 80, porém inferiores aquelas ocorridas com o uso do carbofuran.

As substâncias mais ativas contra o nematoide no teste *in vitro* apresentaram os seguintes valores de CL_{50} : $3,5 \pm 0,4$ (2,4-diaminopirimidina, 13), $0,32 \pm 0,04$ (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, 35), $1,3 \pm 0,1$ (ácido orótico, 14), $0,85 \pm 0,19$ (ácido 2-pirazinocarboxílico, 15), $2,8 \pm 0,1$ (ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico, 16), e $0,55 \pm 0,04$ (pirazinocarboxilato de metila, 17) $\mu\text{mol/ml}$. Vale chamar a atenção para o fato das substâncias 35 e 17 terem sido mais ativas que o nematicida comercial carbofuran, cuja CL_{50} foi de $0,70 \pm 0,01 \mu\text{mol/ml}$ nas mesmas condições empregadas para as substâncias estudadas.

Aplicação das substâncias em substrato infestado com *M. incognita*

Reduções no número de ovos por grama de sistema radicular do tomateiro, estatisticamente semelhantes ($p < 0,001$) ao nematicida carbofuran, foram observadas quando se empregaram as substâncias 2,4-diaminopirimidina (13), pirazinocarboxilato de metila (17), ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (16) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (35) (Figura 3). Em relação aos valores obtidos para as plantas tratadas com o nematicida carbofuran, houve redução de 17% na reprodução de *M. incognita* quando se empregou a substância ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (16). A aplicação das substâncias ácido orótico (14) e ácido 2-pirazinocarboxílico (15) no substrato infestado com J2 de *M. incognita* apresentou o mesmo efeito da aplicação do Tween (controle positivo). 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 (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

Verificou-se no presente trabalho que a di-idrouracila na concentração de $5,4 \mu\text{mol/ml}$ causou 37,5 % de mortalidade nos J2 de *M. incognita* (Tabela 1). Entretanto, na concentração de $4,4 \mu\text{mol/ml}$ essa mesma substância ocasionou 100% de mortalidade nos J2 de *M. exigua* (Oliveira *et*

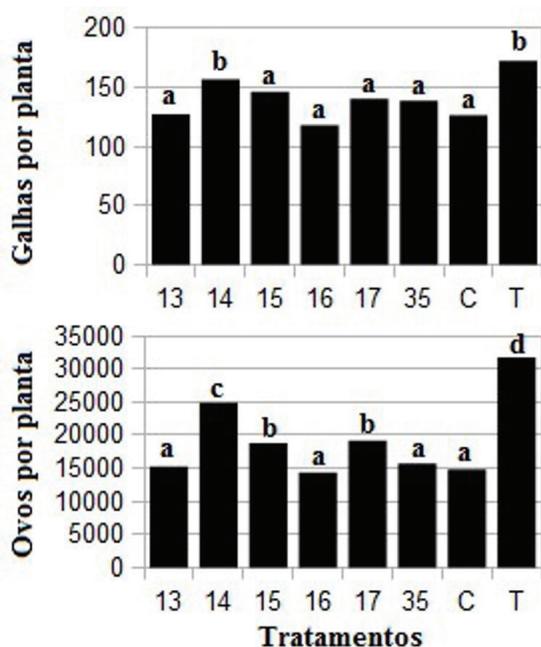


Fig. 3. Número de ovos de *Meloidogyne incognita* por massa de raiz de tomateiro (1/g) versus tratamentos empregados. As substâncias 2,4-diaminopirimidina (13), ácido orótico (14), ácido 2-pirazinocarboxílico (15), ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (16), pirazinocarboxilato de metila (17), cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (35), e carbofuran (C), foram utilizadas nas respectivas concentrações: 9,7, 3,5, 2,4, 7,6, 1,5, 0,7, e 1,9 $\mu\text{mol/ml}$. Todas foram aplicadas em plantas de tomateiro infestadas com 400 J2 de *M. incognita*. Solução aquosa de Tween 80® a 0,01 g/ml (T) foi utilizada como testemunha negativa. Os erros correspondem aos desvios padrões. Barras com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de agrupamento de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Tabela 1. Mobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 h às substâncias análogas de 9H-purina (P) e di-idrouracila (D).

Derivação	Substância ^x	Imobilidade ^z (%)	Mortalidade ^z (%)
D	(1) di-idrouracila	44,2 c	37,5 b
	(2) tioureia	15,7 a	15,7 a
	(3) timina	17,6 a	17,6 a
	(4) 6-aminouracila	22,2 a	17,8 a
	(5) 6-carbetoxi-2-tioureia	22,9 a	19,8 a
	(6) 6-propil-2-tiouracila	25,0 a	22,2 a
	(7) 5-aminouracila	29,3 a	27,8 b
	(8) 5-acetiluracila	33,7 b	28,2 b
	(9) 4,6 diidroxipirimidina	37,2 b	28,7 b
	(10) 2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona	26,7 a	24,7 a
	(11) uracila	42,2 b	36,6 b
	(12) (hidroximetil) uracila	35,9 b	23,0 a
	(13) 2,4-diaminopirimidina	66,3 d	64,6 c
	(14) ácido orótico	90,1 e	88,5 d
	(15) ácido 2- pirazinocarboxílico	98,8 e	91,9 d
	(16) ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico	92,7 e	89,3 d
	(17) pirazinocarboxilato de metila	71,4 d	68,5 c
	(18) 2H-1,3-benzoxazina-2,4-(3H)-diona	27,0 a	21,7 a
	(19) N-hidroxisuccinimida	51,3 c	40,4 b
P	(20) kinetina	10,5 a	10,5 a
	(21) adenina	33,6 b	16,5 a
	(22) 4-aminoantipirina	33,0 b	31,7 b
	(23) 2-fenil-1,3-ditiano	35,0 b	28,3 b
	(24) 4-acetamidoantipirina	29,6 a	20,7 a
	(25) 2,6-diaminopurina	28,2 a	22,6 a
	(26) 2-pirrolidona	10,7 a	10,7 a
	(27) 6-tioguanina	28,1 a	16,9 a
	(28) ácido úrico	28,5 a	28,5 b
	(29) 5-amino-1,3,4-tiodizolo-2-tiol	52,0 c	42,2 b
	(30) (S)-4-(4-aminobenzil)-2-(1H)-oxazolidinona	34,4 b	30,7 b
	(31) 4-amino-6-metoxipirimidina	11,0 a	9,5 a
	(32) 2,4-tiazolinadiona	70,3 d	53,8 c
	(33) brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio	36,1 b	34,2 b
	(34) ácido L-(-)-tiazolidina-4-carboxílico	53,0 c	46,3 b
	(35) cloreto de 2,3,5-trifenilterazólio	90,7 e	81,8 d
	Carbofuran ^y (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
	CV(%)	28,0	29,6

^xSubstâncias testadas na concentração de 5,4 µmol/ml^yConcentração de 9,04 x10⁻¹ µmol/ml^zMédias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferenciam entre si de acordo com o teste de agrupamento de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

al., 2014). Verifica-se também que a atividade nematicida da di-idrouracila, no presente estudo, é bem inferior à observada para o carbofuran (Tabela 1). Logo, a di-idrouracila aparentemente é mais ativa contra *M. exigua* do que contra *M. incognita*. Situação similar foi observada para a 9H-purina em testes *in vitro* (dados não publicados). Tais resultados sugeriam que a di-idrouracila e a 9H-purina não teriam as eficiências necessárias para o controle de *M. incognita* em tomateiros. Daí a necessidade de utilização de análogos dessas duas substâncias, para se conseguir estruturas químicas com maiores atividades nematicidas contra *M. incognita*.

No grupo da di-idrouracila e análogos, observa-se que uracila (**11**) apresentou 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. Quando a carboxila do ácido **15** foi protegida na forma de um éster metílico, gerando o pirazinocarboxilato de metila (**17**), a atividade nematicida foi reduzida significativamente. Ademais, segundo dados da literatura, a pirazina, que corresponde à substância **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 di-idrouracila, também vale mencionar a baixa atividade nematicida *in vitro* de 2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (**10**), e 2H-1,3-benzoxazina-2,4-(3H)-diona (**18**) (Tabela 1), corroborando com o trabalho de Meyer *et al.* (2009).

Quanto aos análogos da 9H-purina, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**) se mostrou bastante ativo (Tabela 1). Há relato de atividade nematicida dessa substância na literatura (Silva *et al.*, 2009), o que corrobora os resultados aqui descritos. 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 (Crawford *et al.*, 2012). No entanto, foi relatada a atividade fitotóxica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**) sobre plantas de alface

e soja, embora isto tenha ocorrido em concentração próxima de 80 vezes superior aquelas que foram empregadas no presente trabalho (Silva *et al.*, 2009).

Quanto aos valores de CL₅₀ para as substâncias mais ativas no teste *in vitro*, observou-se que estes foram próximos do obtido para o carbofuran (Tabela 2). Especificamente para o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**), a CL₅₀ foi próxima daquela relatada para *M. incognita* e *M. exigua* (Silva *et al.*, 2009). Logo, todas as substâncias inicialmente selecionadas para o cálculo da CL₅₀ se mostraram potencialmente úteis para o controle de *M. incognita*.

Em geral, os resultados do teste *in vitro* estão condizentes com aqueles obtidos no experimento *in vivo*, pois a exceção do ácido orótico (**14**) e do ácido 2-pirazinocarboxílico (**15**), todas as outras substâncias reduziram o número de ovos por grama de raiz a valores que não diferiam estatisticamente daquele obtido para as plantas tratadas com o carbofuran (Figura 3). Este é um resultado bastante promissor, especialmente para 2,4-diaminopirimidina (**13**), pirazinocarboxilato de metila (**17**), ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico (**16**), e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**).

Quanto às toxicidades destes compostos, um derivado da 2,4-diaminopirimidina (**13**), o aditoprím, que possui efeito bacteriostático, não causou malformação externa, visceral ou esquelética óbvia 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 administradas por via oral e tópica, ou quando utilizadas 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 baixa toxicidade para o homem e ambiente em geral por parte do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (**35**).

Em relação ao aspecto econômico, que é de fundamental importância para o desenvolvimento de um novo nematicida, os valores comerciais para 1 g das substâncias que apresentaram as maiores atividades nematicidas no presente trabalho são: R\$ 46,00 (ácido 2-pirazinocarboxílico; **35**; pureza ≥ 99,0%), R\$ 324,00 (2,4-diaminopirimidina; **13**; pureza de 98%), R\$ 70,20 (ácido 5-metil-2-pirazinocarboxílico; **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 potencial viabilidade econômica. Logo, são altamente promissoras para o desenvolvimento de novos nematicidas comerciais.

Concluindo, dentre todas as substâncias análogas da di-idrouracila e da 9H-purina que foram submetidas a testes *in vitro* e *in vivo* com *M. incognita*, destacaram-se: 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 di-idrouracila. Essas substâncias reduziram a população de *M. incognita* em tomateiro 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.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro recebido.

LITERATURA CITADA

- Agriannual. 2014. Anuário da Agricultura Brasileira. 440-446 p.
- Amaral, D. R., F. E. R. Oliveira, and D. F. Oliveira. 2003. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. *Nematology* 5(6):859-864.
- Barker, K. R., G. A. Pederson, and G. L. Windham. 1998. *Plant and Nematode Interactions*. Madison, WI : ASA, CSSA, SSA Publishers. 771p.
- Charchar, J. M., e F. A. S Aragão. 2005. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. *Nematologia Brasileira* 29(2):243-249.
- Chen, S. Y., and D. W. Dickson. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32(1):117-121.
- Chitwood, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40:221-49.
- Crawford, M. J., M. W. Dimmic, W. P. Haakenson, Jr., U. Slomczynska, and A. Wideman. 2012. New compositions and methods for controlling nematode pests. The International Patent System, USA. WO 2012030887 A1.
- Hussey, R. S., and K. R. Baker. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57(12):1025-1028.
- Le Bourgeois, M., J. De Blic, J. Paupe, and P. Scheinmann. 1989. Good tolerance of pyrazinamide in children with pulmonary tuberculosis. *Archives of disease in childhood* 64(1):177-178.
- McCarter, J. P. 2008. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematodes. Pp. 239-267 in R. H. Berg and C. G. Taylor (eds.) *Cell Biology of Plant Nematode Parasitic - Plant Cell Monographs*.
- Meyer, S. L. F., C. P. Rice., and I. A. Zasada. 2009. Diboa: Fate in soil and effects on root-knot nematode egg numbers. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1555-1560.
- Oliveira, D. F., H. M. Santos Júnior, A. S. Nunes, V. P. Campos, R. S. C. Pinho, and G. C. Gajo. 2014. 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* 86(2):525-538.
- R CORE TEAM. 2014. R: a language and environment for statistical computing. Viena. Online.<http://www.R-project.org/>
- Ritz, C., and J. C. Streibig. 2005. Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12(5):1-22.
- Sasser, J. N., and C. C. Carter. 1985. *An Advanced Treatise on Meloidogyne: Volume I, Biology and Control*. Department of Plant Pathology and Genetics. Raleigh, NC: North Carolina State University and the United States Agency for International Development.
- Scott, A. J., and M. A. Knott. 1974. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. *Biometrics* 30:502-512.
- Seid, A., C. Fininsa, T. Mekete, W. Decraemer, and W. M. L. Wesemael. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. *Nematology* 17(9):995-1009.
- Sigma-Aldrich. 2015. Online.<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>.
- Silva, W. J. R., A. R. T. Machado, V. A. C. Campos,

- D. F. Oliveira, V. P. Campos, and E. H. Silva. 2009. Activities of substances organic against *Meloidogyne* spp. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Nematologia/ II Congresso Internacional de Nematologia Tropical, 2009, Maceió. Resumos, Brasília: ONTA-SBN 270-270.
- Trudgill D. L., and V. C. Block. 2001. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annual Review of Phytopathology 39:53-77.
- Wang, X., Z. Tan, G. Cheng, I. Awais, L. Huang, D. Chen, Y. Pan, Z. Liu, and Z. Yuan. 2015. Two-generation reproduction and teratology studies of feeding aditoprim in Wistar rats. Journal of Applied Toxicology 35(12):1531-1538.
- Wen, F., Z. Zhang, Y. He, Z. Chen, M. Li, and M. Mo. 2015. Synergism between urea and urease-positive bacteria in controlling root-knot nematodes. European Journal of Plant Pathology 141(1):179-191.

Received:

25/I/2016

Accepted for publication:

9/IX/2016

Recibido:

Aceptado para publicación: