

Extratos Vegetais com Propriedades Nematicidas e Purificação do Princípio Ativo do Extrato de *Leucaena leucocephala**

Flávia R. Cunha^{1**}, Denilson F. Oliveira¹ & Vicente P. Campos²

¹Departamento de Química, e-mail: denilson@ufla.br; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG

(Aceito para publicação em 18/02/2003)

Autor para correspondência: Denilson F. Oliveira

CUNHA, F.R., OLIVEIRA, D.F. & CAMPOS, V.P. Extratos vegetais com propriedades nematicidas e purificação do princípio ativo do extrato de *Leucaena leucocephala*. Fitopatologia Brasileira 28:438-441. 2003.

RESUMO

Inicialmente buscou-se identificar plantas com extratos metanólicos ativos *in vitro* contra o nematóide *Panagrellus redivivus*. Das 24 espécies vegetais estudadas, constatou-se que os melhores resultados foram obtidos com *Leucaena leucocephala*, que causou mortalidade de 93% dos indivíduos expostos ao seu extrato por 24 h. Em seguida,

submeteu-se o referido extrato a fracionamento direcionado pelos testes *in vitro* com *P. redivivus*, o que possibilitou isolar uma substância nematicida que, segundo análises preliminares, correspondia a um alcalóide.

Palavras-chave adicionais: nematóide, *Panagrellus redivivus*, planta.

ABSTRACT

Nematocidal plant extracts and purification of active ingredients of *Leucaena leucocephala* extract

Initially this work was aimed to identify plant methanolic extracts toxic *in vitro* to the nematode *Panagrellus redivivus*. Among 24 plant species studied, *Leucaena leucocephala* afforded the best

results, as 93% of the nematodes were dead after exposure to its extract during 24 h. Thus, such extract was submitted to a purification process guided by *in vitro* assays with *P. redivivus*. As a result, one substance active against such nematode was isolated. According to preliminary analysis, that seems to be an alkaloid.

Os nematóides parasitas de plantas causam consideráveis reduções na produtividade agrícola, já que acarretam perda da ordem de US\$ 100 bilhões anualmente (Tihohod, 1993). Dentre as táticas de controle desses fitoparasitas, destaca-se o uso de nematicidas sistêmicos que, além de aumentarem os custos de produção, apresentam riscos ao homem e ao meio ambiente (Campos *et al.*, 1998). Uma alternativa de menor impacto ecológico tem sido o uso de plantas antagonicas, que produzem metabólitos com propriedades nematostáticas ou nematicidas, após a penetração do fitonematóide, ou podem tê-los constitutivamente. Algumas dessas substâncias são excretadas pelas raízes, como no caso do α -tertienila, produzido por *Tagetes erecta* Linn. Outros exemplos de substâncias de origem vegetal com propriedades nematicidas são o alcalóide monocrotalina, o ácido butírico e o pirocatecol, isolados de tecidos de *Crotalaria spectabilis* Roth e *Eragrostis curvula* Nees, respectivamente (Ferraz & Vale, 1997).

Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle de fitonematóides, inicialmente, buscou-se identificar extratos vegetais com atividade antagonica *in vitro* ao nematóide bacteriófago *Panagrellus redivivus* L. Apesar de não se tratar de um parasita de plantas,

a referida espécie foi utilizada pelo fato de poder ser facilmente mantida e multiplicada em laboratório, o que representa vantagem sobre as espécies fitoparasitas, que demandam o cultivo de plantas infetadas. Além de buscar identificar extratos vegetais com propriedades nematicidas, este trabalho também é parte de um projeto que visa ao estabelecimento de métodos mais fáceis de detecção de substâncias nematicidas, para serem empregados em períodos cujas condições sejam adversas à manutenção e multiplicação de fitonematóides.

Por ter proporcionado a maior taxa de mortalidade de *P. redivivus*, o extrato de *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit foi submetido a fracionamento, visando à purificação e identificação da substância nematicida.

Obtenção dos extratos vegetais

Para o presente trabalho foram colhidas folhas de todas as plantas estudadas e flores de *Pelargonium hortorum* L. H. Bailey e de *Dredanthea grandiflorum* Kitam, no campus da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1). Um grama de cada amostra foi picado e imerso em metanol P.A. por 48 h. Filtraram-se as suspensões resultantes em algodão e colocaram-se os resíduos obtidos em mais metanol. Após 48 h, procedeu-se a nova filtração em algodão. As fases metanólicas obtidas nas duas filtrações foram reunidas e, em seguida, concentradas em evaporador rotatório até *secura*. O resíduo obtido foi solubilizado em 10 ml de solução aquosa de Tween 80 [monooleato

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras (2002).

**Bolsista do CNPq.

de polioxietileno (20) sorbitan] a 1% (g/ml), para ser usado no teste *in vitro* com *P. redivivus*.

Teste *in vitro* com *P. redivivus*

Placas de Petri contendo meio de cultura aveia-água, infestadas com *P. redivivus*, foram lavadas com água destilada e esterilizada, originando uma suspensão de nematóides que foi imediatamente passada através de peneiras sobrepostas de 60, 200 e 400 mesh. Em funil de vidro fechado na parte inferior (Funil de Baermann), contendo água e peneira de malha fina com filtro de papel, foram vertidos os nematóides retidos na peneira de 400 mesh, usando-se jatos de água provenientes de uma pisseta. Após 30 min, a parte inferior do funil foi aberta, o que permitiu recolher uma suspensão aquosa de nematóides, que foi calibrada com a adição ou retirada de água, para 20-30 nematóides por 10 µl.

Em células de placas tipo Elisa, previamente lavadas com detergente, álcool e água destilada, foram colocados 10 µl da suspensão de nematóides e 240 µl da amostra a ser testada. As contagens do número de indivíduos vivos e mortos foram realizadas com 24, 36 e 48 h, com auxílio de microscópio de objetiva invertida. Empregou-se como testemunha positiva solução aquosa de Aldicarbe (200 ppm) e como testemunha negativa solução aquosa de Tween 80 a 1% (g/ml). Empregaram-se seis repetições em todos os casos, cujos resultados obtidos foram transformados para percentagem e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pela aplicação do teste de Tukey (5%). Consideraram-se indivíduos mortos aqueles sem movimento.

Fracionamento do extrato de *L. leucocephala*

O extrato metanólico de 520 g de folhas frescas de *L. leucocephala*, obtido conforme descrito anteriormente, foi concentrado em evaporador rotatório até 1/5 do volume inicial, o que resultou em suspensão aquosa. Esta foi, a seguir, submetida à extração com hexano (2 x 55 ml) e acetato de etila (2 x 55 ml). Obtiveram-se assim, três fases líquidas, das quais se retiraram alíquotas correspondentes a 0,1% dos respectivos volumes, que foram concentradas em evaporador rotatório até *secura* e solubilizadas em 5 ml de Tween 80 a 1% (g/ml), para serem submetidas ao teste *in vitro* com *P. redivivus*.

Os 200 ml da fase aquosa, resultantes do processo de extração com hexano e acetato de etila, foram liofilizados, rendendo resíduo com massa igual a 18,34 g. Realizaram-se sucessivas lavagens de 0,035 g de tal resíduo com acetato de etila (4 ml), metanol (4 ml) e água (4 ml). As três fases líquidas resultantes das lavagens foram concentradas em evaporador rotatório até *secura* e dissolvidas em 5 ml de solução aquosa de Tween 80 a 1% (g/ml), para serem submetidas ao teste *in vitro* com *P. redivivus*.

O restante do resíduo obtido pelo processo de liofilização foi lavado várias vezes com metanol (7 x 100 ml). Todas as fases metanólicas foram reunidas e concentradas sob vácuo até *secura*, o que originou resíduo com massa de 12,82 g. Parte deste (3,08 g) foi fracionada em coluna de 3 x 17 cm de sílica gel 60 (Merck), empregando-se acetato de etila

(150 ml), metanol (150 ml), água (150 ml) e HCl 0,1 M (150 ml), como eluentes. Alíquotas das quatro frações obtidas, correspondentes a 0,8% do volume de cada, foram concentradas em evaporador rotatório até *secura* e dissolvidas em 5 ml de solução aquosa de Tween 80 para serem submetidas ao teste *in vitro* com *P. redivivus*.

A fração de HCl 0,1 M foi concentrada sob vácuo até *secura*, o que originou resíduo semi-sólido, com massa de 0,179 g. Este, mais uma vez, foi fracionado por cromatografia em coluna de 3 x 15 cm da mesma sílica. Para tanto, empregaram-se 150 ml de cada uma das soluções: acetato de etila/ ácido acético (10:3); acetato de etila/ metanol/ ácido acético (8,5:1,5:3); acetato de etila/ metanol/ ácido acético (8:2:3)/ acetato de etila/ metanol/ ácido acético (6,7:3,3:3) e acetato de etila/metanol/ácido acético (5:5:3), como eluentes. Obtiveram-se 60 frações, que foram combinadas de acordo com resultados de análise por cromatografia em camada fina (CCF) e por espectrometria no infravermelho. Com isso, ao final havia dez frações combinadas: 1-12, 13-19, 20-22, 23-27, 28-29, 30-35, 36-52, 53-54, 55-57 e 58-60. Alíquotas correspondentes a 5% do volume de cada foram concentradas em evaporador rotatório até *secura* e dissolvidas em 5 ml de solução aquosa de Tween 80 a 1% (g/ml), para serem submetidas ao teste *in vitro* com *P. redivivus*. Após concentração, a fração combinada 58-60 foi analisada por CCF, com placas de sílica gel. Para a revelação, empregaram-se solução etanólica de ácido fosfomolibdico e reagente de Dragendorf (Wagner *et al.*, 1983). Em ambos os casos, observou-se que tal fração era composta por apenas uma substância que tinha R_f (distância percorrida pela substância/ distância percorrida pelo eluente) igual a 0,25 quando se empregava acetato de etila/metanol/ácido acético (5:5:3) como eluente. Após total remoção dos solventes da fração 58-60 sob vácuo, obteve-se um sólido com massa de 0,02 g.

Das 24 espécies vegetais testadas (Tabela 1), obtiveram-se resultados mais promissores com os extratos de *L. leucocephala* e *Paspalum notatum* Flüggé, que induziram 98,69% e 94,43% de mortalidade de *P. redivivus*, respectivamente (Tabela 2). No caso específico de *L. leucocephala*, os dados apresentados corroboram os resultados de Gonzaga (1992) que, em testes *in vivo*, conseguiu redução do número de galhas de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood em plantas indicadoras cultivadas após *L. leucocephala*. Ademais, está de acordo com resultados de testes *in vitro* realizados com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* e de *Meloidogyne exigua* Goeldi. Em ambos os casos, o extrato de *L. leucocephala* provocou altas taxas de mortalidade de J2 (Costa, 1999; 2000). Em relação a *P. notatum*, Rodríguez-Kábana & Canullo (1992) comprovaram bons resultados desta gramínea no controle de *Meloidogyne arenaria* Neal e *Heterodera glycines* Ichinohe, e a caracterizaram como não hospedeira desses nematóides. O fato de o extrato ter apresentado atividade contra *P. redivivus* foi um indício de que uma das suas formas de ação contra fitonematóides pode basear-se na produção de substâncias nematocidas.

Para várias das outras plantas testadas, esperava-se a obtenção de resultados confirmando a atividade nematocida,

uma vez que havia relatos na literatura demonstrando que podiam produzir substâncias ativas contra fitonematóides (Ferraz & Valle, 1997). *Tagetes erecta* Linn, por exemplo, da qual já foram isoladas substâncias tóxicas a nematóides, forneceu resultado estatisticamente idêntico ao da testemunha água. De forma análoga, pode-se mencionar *Zinnia elegans* Jacq, cujo extrato tem considerável ação contra *M. incognita* (Bano et al., 1986). Ainda é possível citar *Crotalaria juncea* L. (Silva et al., 1990), *Ricinus communis* L. (Rodríguez-Kábana & Canullo, 1992), *Stylosanthes gracilis* H. B. K. (Gonzaga, 1992) e *Catharanthus roseus* G Don (Krishnamurthy & Murthy, 1993), que apesar de se mostrarem ativas contra fitonematóides, não tiveram nenhum efeito sobre *P. redivivus*.

Nos casos de *Bougainvillea glabra* Choisy e *Carica papaya* L., apesar dos baixos valores obtidos, os extratos correspondentes apresentaram efeitos contra *P. redivivus*, o que está de acordo com dados da literatura que relatam tais plantas como antagônicas a fitonematóides (Rao & Reddy, 1992; Siddiqui et al., 1992).

Quanto aos extratos de *Allium sativum* L. e de *Allium cepa* L., que são ativos contra fitonematóides (Costa, 2000), observou-se que a percentagem de *P. redivivus* mortos após 24 h estava próxima daquela obtida para o extrato de *P. notatum*.

Os dados obtidos indicam que não há uma relação simples entre o comportamento de *P. redivivus* e de fitonematóides frente a substâncias de origem vegetal. Apenas para

TABELA 1 - Espécies vegetais coletadas para a obtenção dos extratos vegetais empregados nos testes *in vitro* com *Panagrellus redivivus*

Nome científico	Família	Nome comum
<i>Allium cepa</i> L.	Poaceae	cebola
<i>A. sativum</i> L.	Poaceae	alho
<i>Asparagus densiflorus</i> Myrcsii	Liliaceae	aspargo ornamental
<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	Nyctaginaceae	buganville
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf	Poaceae	capim-Braquiária
<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	Mamão
<i>Catharanthus roseus</i> G. Don	Apocynaceae	vinca
<i>Clerodendrum thomsonae</i> Balf	Verbenaceae	clerodendro trepador
<i>Coffea arabica</i> L.	Rubiaceae	Café
<i>Crotalaria juncea</i> L.	Leguminosae	Crotalária
<i>Drepanthema grandiflorum</i> Kitam	Compositae	Crisântemo
<i>Eucaliptos</i> sp	Myrtaceae	eucalipto
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd	Euphorbiaceae	bico-de-papagaio
<i>Ficus carica</i> L.	Moraceae	figo
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam) De Wit	Leguminosae	leucena
<i>Leucaena</i> sp	Leguminosae	Árvore de leucena
<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardeaceae	manga
<i>Paspalum notatum</i> FIÜggé	Poaceae	grama-batatais
<i>Pelargonium hortorum</i> L. H. Bailey	Geraniaceae	Gerânio
<i>Plumeria rubra</i> Linn	Apocynaceae	jasmim-manga
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	mamona
<i>Stylosanthes gracilis</i> H. B. K.	Leguminosae	stilosantes
<i>Tagetes erecta</i> Linn	Compositae	cravo-de-defunto
<i>Zinnia elegans</i> Jacq	Compositae	Zínia

Coletaram-se folhas de todas as plantas e flores de *P. hortorum* e *D. grandiflorum*

alguns dos extratos empregados, como os de *A. cepa*, *A. sativum*, *B. glabra*, *C. papaya* L. *leucocephala* e *P. notatum*, parece possível empregar o nematóide de vida livre para testes iniciais. No entanto, como esse resultado é decorrente de comparações com dados da literatura, obtidos em condições que não seguem a metodologia aqui descrita, faz-se necessário estudar o problema de forma mais minuciosa. De qualquer forma, como o maior percentual de mortalidade de *P. redivivus* nos testes *in vitro* foi observado para o extrato de *L. leucocephala* que, como mencionado anteriormente, tem atividade contra fitonematóides, selecionou-se a referida planta para a etapa de purificação de substâncias nematicidas. Sendo assim, submeteu-se o respectivo extrato metanólico concentrado à partição líquido-líquido, o que permitiu obter três conjuntos de substâncias distintas: apolares (fase de hexano), semipolares (fase de acetato de etila) e polares (fase aquosa) (Harborne, 1998). Verificou-se que apenas a fase aquosa apresentava atividade contra *P. redivivus*, o que deixou evidente que a substância nematicida produzida por tal planta era consideravelmente polar.

TABELA 2 - Mortalidade de *Panagrellus redivivus* por extratos de diferentes plantas e por Aldicarbe a 200 ppm

Tratamento	<i>Panagrellus redivivus</i> mortos (%)	
	24 h	48 h
<i>Carica papaya</i>	0,00 a	15,36 b,c
<i>Pelargonium hortorum</i>	0,00 a	0,00 a
<i>P. hortorum</i> (flores)	0,00 a	0,41 a
<i>Asparagus densiflorus</i>	0,33 a	0,90 a
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	0,36 a	0,36 a
<i>Ficus carica</i>	0,39 a	0,91 a
<i>Eucaliptos</i> sp	0,46 a	0,39 a
<i>Brachiaria decumbens</i>	0,62 a	11,054 b
<i>Drepanthema grandiflorum</i> (flores)	0,87 a	5,05 a
<i>Zinnia elegans</i>	1,29 a	5,98 a,b
<i>Stylosanthes gracilis</i>	2,22 a	1,90 a
<i>Tagetes erecta</i>	2,45 a	1,19 a
<i>Plumeria rubra</i>	3,07 a	3,07 a
<i>Catharanthus roseus</i>	3,18 a	5,40 a,b
<i>Clerodendrum thomsonae</i>	3,55 a	4,78 a
<i>Crotalaria juncea</i>	3,59 a	4,41 a
<i>Ricinus communis</i>	3,85 a	
<i>Leucaena</i> sp	3,96 a	29,75 c
<i>Mangifera indica</i>	4,96 a	26,43 c
<i>Drepanthema grandiflorum</i>	5,29 a	36,33 c
<i>Coffea arabica</i>	5,40 a,b	
<i>Bougainvillea glabra</i>	10,02 b	23,39 c
<i>Allium sativum</i>	18,00 b,c	
<i>A. cepa</i>	27,83 c	
<i>Paspalum notatum</i>	31,97 c	94,43 d
<i>Leucaena leucocephala</i>	93,26 d	98,69 d
Testemunha água	0,57 a	0,98 a
Aldicarbe	100,00 d	100,00 d

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação igual a 5,63% e 12,23% para leituras com 24 h e 48 h, respectivamente

Como a fase aquosa era a única apresentando atividade contra *P. redivivus*, foi liofilizada e submetida ao próximo processo de fracionamento. Inicialmente, uma pequena alíquota do resíduo obtido foi subseqüentemente lavada com acetato de etila, metanol e água, o que gerou três fases líquidas. A mais ativa era a fase metanólica, com mortalidade semelhante ($P \leq 0,01$) ao Aldicarbe. Tal resultado indicava que a solubilidade da substância ativa em acetato de etila era muito baixa e alta em metanol. Somando-se isto ao fato da massa da fase de acetato de etila, após remoção do solvente sob vácuo, ser visualmente desprezível perante a massa da fase de metanol, optou-se por lavar o resíduo da liofilização várias vezes com metanol. Acreditava-se que com isso, toda a substância ativa seria dissolvida em metanol.

Após concentração da solução metanólica, submeteu-se parte do resíduo obtido ao fracionamento em coluna de sílica gel, o que resultou em quatro frações. Destas, apenas a de HCl 0,1 M se mostrou ativa contra *P. redivivus*, o que também é indicativo de alta polaridade por parte da substância nematocida.

A fração de HCl 0,1 M foi concentrada sob vácuo e submetida a outro processo cromatográfico, o que resultou na obtenção de 60 frações. Ao serem combinados, os números de frações foi reduzido para dez, das quais apenas as cinco últimas a eluírem da coluna se mostraram ativas contra *P. redivivus* (Tabela 3)

As cinco frações ativas do último processo cromatográfico foram submetidas à análise por cromatografia em camada fina, mas só foi possível notar alguma mancha no caso da fração 58-60. Para esta, observou-se que havia apenas uma substância quando se utilizava o reagente de Dragendorf como revelador. Este resultado indicava que a substância presente na fração 58-60 continha pelo menos um átomo de nitrogênio na sua estrutura (Wagner *et al.*, 1983), o que está de acordo

TABELA 3 - Mortalidade de *Panagrellus redivivus* após incubação por 36 h em frações resultantes da cromatografia em coluna da fração de HCl do extrato de *Leucaena leucocephala*.

Fração	<i>Panagrellus redivivus</i> mortos (%)*
1 a 12	1,95 d
13 a 19	2,19 d
20 a 22	7,11 d
23 a 27	5,96 d
28 a 29	6,91 d
30 a 35	78,08 bc
36 a 52	71,49 c
53 e 54	79,07 bc
55 a 57	87,56 ab
58 a 60	93,37 a
Testemunha água	6,27 d
Aldicarb	100,00 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação igual a 18,45%.

com dados da literatura que sugerem que a substância nematocida produzida por *L. leucocephala* seja um alcalóide (Villaseñor *et al.*, 1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANO, M., ANVER, S. & TIVAGI, S.A. Evaluation of nematocidal properties of some members of the family Compositae. International Nematology Network Wersletter 3:15-25. 1986.
- CAMPOS, V.P., SOUZA, J.T. & SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. Revisão Anual de Patologia de Plantas 285-327. 1998.
- COSTA, M.J.N. Filtrados de culturas fúngicas e extratos de plantas e de esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. (Tese de Mestrado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2000.
- COSTA, M.J.N., AMARAL, D.R., CAMPOS, V.P. & OLIVEIRA, D.F. Efeito de extratos vegetais na mobilidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp. Anais, XIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-MG, São João del Rei, MG. 1999. p.151.
- FERRAZ, S. & VALLE, L.A. Controle de fitonematóide por plantas antagonicas. Viçosa. UFV. 1997. Cadernos Didáticos.
- GONZAGA, V. Reação de cultivares a linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3 e avaliações de plantas antagonistas para o controle destes nematóides. (Tese de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1992.
- HARBORNE, J.B. Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3rd ed. London. Chapman & Hall. 1998.
- KRISHNAMURTHY, G.V.G. & MURTHY, P.S.N. Further studies with plant extracts on root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) larvae. In: Chari, M.S. & Ramaprasad, G. (Eds.) Botanical Pesticides in Integrated Pest Management. Rajahmundry. Indian Society of Tobacco Science. 1993. pp.438-448.
- RAO, M.S. & REDDY, P. Studies on the comparative efficacy of certain plant leaves and carbofuran in the management of *Meloidogyne incognita* on tomato. Current Nematology 3:5-6. 1992.
- RODRIGUEZ-KABANA, R. & CANULLO G.H. Cropping systems for the management of phytonematodes. Phytoparasitica 20:211-224. 1992.
- SIDDIQUI, Z.A., HASEEB, A. & ALAM, M.M. Control of plant parasitic nematodes by soil amendments with latex bearing plants. Indian Journal of Nematology 22:25-28. 1992.
- SILVA, G.S., FERRAZ, S. & ANTOS, J.M. Efeito de *Crotalaria* spp. sobre *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* raça 3 e *M. exigua*. Fitopatologia Brasileira 15:94-96. 1990.
- TIHOHOD, D. Nematologia Agrícola Aplicada. 1. Jaboticabal. Funep. 1993.
- VILLASEÑOR, I.M., GAJO, R.M.T. & GONDA, R.C. Bioactivity studies on the alkaloid extracts from the seed of *Leucaena leucocephala*. Phytotherapy Research 11:615-617. 1997.
- WAGNER, H., BADT, S. & ZGAINSKI, E.M. Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin. 1983.