



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TAMIRES SCUPINARI

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *CROTALARIA*  
*SPECTABILIS* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL NO  
CONTROLE DE NEMATÓIDES DA SOJA**

---

Londrina  
2018

TAMIRES SCUPINARI

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *CROTALARIA  
SPECTABILIS* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL NO  
CONTROLE DE NEMATOIDES DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina como pré requisito na obtenção do título de Mestra em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Scupinari, Tamires.

Estudo fitoquímico da espécie *Crotalaria spectabilis* e avaliação de seu potencial no controle de nematoides da soja / Tamires Scupinari. - Londrina, 2018.  
74 f. : il.

Orientador: Maria Luiza Zeraik.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Fitoquímica - Tese. 2. *Crotalaria spectabilis* - Tese. 3. Nematóide de cisto da soja - Tese. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência - Tese. I. Zeraik, Maria Luiza. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

TAMIRES SCUPINARI

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *CROTALARIA SPECTABILIS* E  
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL NO CONTROLE DE NEMATÓIDES  
DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Química da Universidade  
Estadual de Londrina como pré requisito na  
obtenção do título de Mestra em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Carla Cristina Perez  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Armando Mateus Pomini  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 25 de Outubro de 2018

Dedico este trabalho a minha família,  
Mãe (Juliana), irmãos (Matheus e  
Arthur), Vander e Vó (Alice) por todo  
amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À toda minha família, em especial minha mãe Juliana, que lutou comigo em todos os momentos, para uma boa formação acadêmica e pessoal.

À professora Dra. Maria Luiza Zeraik, pela orientação, pelos diversos ensinamentos acadêmicos e incentivos, além da amizade.

À Dra. Estela de Oliveira Nunes, Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo, e ao grupo de Ecologia Química da Embrapa soja, pela confiança na realização desse projeto, por todo aprendizado e tempo dedicado.

À banca examinadora deste trabalho, Dra. Carla Cristina Perez e Dr. Armando Mateus Pomini por disporem de tempo e energia para avaliarem e contribuírem para o trabalho de defesa.

Ao Dr. Waldir Pereira Dias, e toda equipe, muito competente e trabalhadora, da nematologia da Embrapa soja (Anita, Angelo, Claudemir, Ivani, Manuel, Marcos e Michele) por fornecerem os nematoides, pela ajuda no campo e laboratório.

À Helena Russo, do instituto de química da UNESP Araraquara, pela ajuda na realização dos ensaios cromatográficos, e por toda orientação na utilização de softwares e durante as análises.

À Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio, e ao Laboratório de Químiometria em Ciências Naturais da, LQCN – UEL, por todo auxílio.

Aos professores e ao programa de pós graduação em Química da UEL.

Aos amigos do 339, LabFitobio e da Ecologia química, em especial: Ivanira Moreira, Neiva Peireira, Janaina Claro, Marcela B. de Abreu, Anna Ferrari, Giselle Lopes, Elisangela Rosa, George Azevedo (BBrs) e meus filhotes: Anne Miyazaki, Guilherme Camargo e Gustavo Cotrin.

Aos meus excelentes amigos: Denise Souza, Bianca Fernandes, Leandro Oliveira, Rodrigo Pereira, Vanessa Idalgo, Larissa Oliveira, Anderson Jr. Abreu, Gustavo Galo, Jéssica Scremin, José Perez, Diego Gazola, Suelen Magalhães, Barbara Dias, Patricia Braga, Tatiana Ueda, Giovana Ramos, Rejane Stubs, Max Falone e João Coelho.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

A todas(os) que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desta pesquisa meu mais singelo... Obrigada!

*“Disse a flor para o pequeno príncipe:  
- É preciso que eu suporte duas ou três larvas se  
quiser conhecer as borboletas.”*

Antoine de Saint-Exupéry

SCUPINARI, Tamires. **Estudo fitoquímico da espécie *Crotalaria spectabilis* e avaliação de seu potencial no controle de nematoides da soja**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A soja (*Glycine max*) é um produto de extrema importância para economia brasileira. Os grãos têm grande valor nutritivo devido aos altos teores proteicos. Contudo, a produção de soja é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. Os nematoides são as maiores fontes de estresse biótico experimentado pelas plantas de soja, sendo as espécies *Heterodera glycines* e *Meloidogine javanica* causadoras das maiores perdas econômicas do país. Esses animais parasitam as plantas, dificultando a absorção de nutrientes e afetando a produção de soja. O gênero *Crotalaria* é conhecido por apresentar espécies ricas em alcaloides pirrolizidínicos, metabólitos secundários que atuam como mecanismo de defesa contra herbivoria. A *Crotalaria spectabilis* é uma das espécies utilizada como rotação de cultura para suprimir populações de nematoides no solo. A maioria dos estudos relacionados às substâncias quimicamente ativas de *Crotalaria spectabilis*, remetem à monocrotalina. Assim, o objetivo desse trabalho consistiu na análise fitoquímica, avaliação nematostática e nematocida de folhas e sementes de *C. spectabilis*, em busca de novas substâncias bioativas identificadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM). No processo de otimização da extração, foram empregados o planejamento fatorial, usando dois solventes em duas partes da planta de *C. spectabilis*, totalizando quatro extratos que foram testados para os dois nematoides citados. Segundo os parâmetros obtidos pela Análise de Variância (ANOVA) para os ensaios biológicos, os extratos NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) de folhas e sementes na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>, apresentaram maior ação nematocida sob *H. glycines*, com taxas de mortalidade acima de 90% dos indivíduos testados. Para *M. javanica*, a taxa de mortalidade para o extrato de folhas NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) foi de 89%. Nas análises por CLAE-EM/EM foram identificadas quatro substâncias: a monocrotalina, monocrotalina *N*-óxido, senecionina *N*-óxido e a rutina. A confirmação ocorreu por meio do padrão de fragmentação confirmado por mecanismos e valores da literatura. O extrato NaHCO<sub>3</sub> 5%(m/v) de folhas também apresentou atividade nematostática.

**Palavras chave:** Soja. Nematoides. *Crotalaria spectabilis*. Cromatografia.

SCUPINARI, Tamires. **Phytochemical study of *Crotalaria spectabilis* specie and evaluation of its potential in soybean nematodes control.** 2018. 74 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is a product of extreme importance for the Brazilian economy. The grains have great nutritional value, due to high protein contents. However, soybean production is affected by several biotic and abiotic factors. Nematodes are the major sources of biotic stress experienced by soybean plants, being the species *Heterodera glycines* and *Meloidogine javanica* are the greatest ones that causes, economic losses of the country. These animals parasitize the plants, making it difficult the absorption of nutrients, and affecting the soybean production. The genus *Crotalaria* is known to have species rich in pyrrolizidine alkaloids, secondary metabolites that act as a defense mechanism against herbivory. *Crotalaria spectabilis* is one of the species used as crop rotation to suppress nematode populations in the soil. Most of the studies related to chemical active substances of *Crotalaria spectabilis*, refer to the monocrotaline. Therefore, the objective of this work was to perform a phytochemical analysis, nematostatic and nematicide evaluation of *C. spectabilis* leaves and seeds, searching for the identification of new bioactive substances through the techniques of high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS/MS). In the process of optimization of the extraction, factorial planning was used, using two solvents in two parts of the of *C. spectabilis* plant, totalizing four extracts that were tested for the two mentioned nematodes. According to the parameters obtained by Variance Analysis (ANOVA) for the biological assays, NaHCO<sub>3</sub> extracts 5% (m/v) of leaves and seeds at the concentration of 20 mg mL<sup>-1</sup> presented higher nematicidal action under *H. glycines*, with mortality rates above 90% of the individuals tested. For *M. javanica*, the mortality rate for NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) leaf extract was 89%. In the analyzes by HPLC-MS/MS, four substances were identified: monocrotaline, monocrotaline *N*-oxide, senecionina *N*-oxide and rutin. Confirmation occurred through the fragmentation pattern confirmed by mechanisms and values in the literature. The NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) leaves extract also presented nematostatic activity.

**Key words:** Soybean. Nematodes. *Crotalaria spectabilis*. Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Nematoide juvenil J2 (a) e fêmeas de <i>Heterodera glycines</i> (b).....	13
Figura 2.	Nematoide Juvenil de <i>Meloidogyne javanica</i> (a) e reboleiras formadas nas raízes de soja (b).....	14
Figura 3.	<i>Crotalaria spectabilis</i> florida e com vagens. ....	18
Figura 4.	Estrutura básica dos alcaloides pirrolizidínicos .....	18
Figura 5.	Estrutura da (a) monocrotalina; (b) ácido monocrotálico; e (c) retronecina. ....	19
Figura 6.	Ativação metabólica da monocrotalina pelo citocromo P450 .....	20
Figura 7.	Esquema representativo para análise fitoquímica de compostos.....	31
Figura 8.	Gráfico de Pareto para o ensaio de imobilidade de nematoides (efeito nematostático) frente aos extratos de <i>C. spectabilis</i> .....	34
Figura 9.	Superfície de resposta para ensaio <i>in vitro</i> de imobilidade de nematoides em função do solvente extrator e parte da planta .....	35
Figura 10.	Gráfico de Pareto, gerado a partir dos resultados da ANOVA, obtidos dos ensaios de susceptibilidade de nematoides.....	38
Figura 11.	Superfície de resposta para porcentagem da mortalidade de nematoides em função da parte da planta e do o solvente extrator. ....	39
Figura 12.	Superfície de contorno para porcentagem da mortalidade de nematoides em função da interação da parte da planta com solvente extrator.....	39
Figura 13.	Superfície de resposta para porcentagem de mortalidade de nematoides em função da parte da planta com a espécies de nematoide.....	40
Figura 14.	Superfície de contorno para porcentagem de mortalidade de nematoides em função da espécie de nematoide e da parte da planta. ....	41
Figura 15.	Superfície de resposta para a porcentagem de mortalidade de nematoides em função da do solvente extrator e espécie de nematoide.....	42

Figura 16. Superfície de contorno para percentagem de mortalidade de nematoides em função do solvente extrator com a espécie de nematoide.....	42
Figura 17. Cromatograma relativo ao extrato NaHCO <sub>3</sub> 5% (m/v) de sementes de <i>C. spectabilis</i> , com detecção em $\lambda = 280$ nm, obtido por CLAE-UV/DAD .....	44
Figura 18. Cromatograma do extrato NaHCO <sub>3</sub> 5% (m/v) de folhas de <i>C. spectabilis</i> , obtido por CLAE-UV/DAD.....	45
Figura 19. Cromatogramas do extrato EtOH 80% (v/v) de (a) sementes e (b) folhas de <i>C. spectabilis</i> obtidos por CLAE-UV/DAD. ....	47
Figura 20. Cromatograma de íon total do extrato EtOH 80% (v/v) de (a) sementes e (b) folhas de <i>C. spectabilis</i> obtido por CLAE-EM/EM.....	49
Figura 21. Cromatograma de íon total (TIC) do extrato NaHCO <sub>3</sub> de (a) sementes e (b) folhas de <i>C. spectabilis</i> obtido por CLAE-EM/EM, no modo positivo. ....	50
Figura 22. Cromatogramas do íon de <i>m/z</i> 326 selecionado a partir dos cromatogramas de íon total (TIC) dos extratos NaHCO <sub>3</sub> e EtOH 80% de sementes e EtOH 80% de folhas de <i>C. spectabilis</i> . ....	52
Figura 23. Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM com o padrão de fragmentação para o íon de <i>m/z</i> 326,12 do extrato EtOH 80% de sementes de <i>C. spectabilis</i> .....	54
Figura 24. Proposta de fragmentação do íon <i>m/z</i> 326,12 a partir da estrutura do metabólito monocrotalina. ....	55
Figura 25. Cromatogramas do íon de <i>m/z</i> 342 selecionado a partir do TIC dos extratos hidroalcoólicos de folhas e sementes de <i>C. spectabilis</i> .....	57
Figura 26. Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM para o íon de <i>m/z</i> 342 referente ao extrato etanólico de folhas de <i>C. spectabilis</i> .....	58
Figura 27. Proposta de fragmentação do íon de <i>m/z</i> 342,12 a partir da estrutura do metabólito monocrotalina <i>N</i> -óxido. ....	59
Figura 28. Cromatogramas do íon <i>m/z</i> 352 selecionado a partir dos cromatogramas de íon total (TIC) presente nos dois extratos de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> .....	60

Figura 29. Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM para o íon precursor de $m/z$ 352,11 proveniente da análise do extrato alcalino de sementes de <i>C. spectabilis</i> . .....	61
Figura 30. Proposta de fragmentação do íon $m/z$ 352,12 a partir da estrutura do metabólito senecionina <i>N</i> -óxido. ....	62
Figura 31. Cromatograma do íon de $m/z$ 611,12 selecionado a partir do TIC do extrato EtOH de sementes de <i>C. spectabilis</i> . ....	63
Figura 32. Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM para o íon de $m/z$ 611,12 e suas fragmentações em MS2 e MS3 a partir do extrato EtOH 80% de sementes de <i>C. spectabilis</i> . ....	64
Figura 33. Proposta de fragmentação para o íon de $m/z$ 611,12 a partir da estrutura da rutina. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Substâncias encontradas em diferentes espécies de <i>Crotalaria</i> .....	22
Tabela 2.	Fatores e níveis do planejamento fatorial $2^3$ .....	28
Tabela 3.	Distribuição de ordem normal para planejamento fatorial $2^3$ para os ensaios “ <i>in vitro</i> ” de extratos de <i>C. spectabilis</i> . .....	28
Tabela 4.	Métodos otimizados para as análises dos extratos de <i>Crotalaria spectabilis</i> por CLAE-UV e CLAE-EM/EM.....	30
Tabela 5.	Distribuição de ordem normal para planejamento fatorial $2^3$ e as respostas dos ensaios <i>in vitro</i> para extratos de <i>C. spectabilis</i> . .....	33
Tabela 6.	Análise de variância para os ensaios de atividade nematostática com os extratos de <i>C. spectabilis</i> na concentração de $20 \text{ mg mL}^{-1}$ .....	34
Tabela 7.	Distribuição experimental do planejamento fatorial $2^3$ e respostas de porcentagem de mortalidade de nematoides.....	36
Tabela 8.	Análise de variância (ANOVA) para os ensaios de mortalidade de nematoides expostos aos extratos na concentração de $20mg \text{ mL}^{-1}$ .....	37
Tabela 9.	Revisão da literatura de substâncias encontradas em diversas espécies <i>Crotalaria</i> .....	48
Tabela 10.	Substâncias identificadas nos extratos de <i>C. spectabilis</i> .....	51
Tabela 11.	Relação de fragmentos de monocrotalina obtidos experimentalmente por CLAE-EM/EM e fragmentos relatados na literatura* .....	56
Tabela 12.	Presença ou ausência de monocrotalina (1), monocrotalina <i>N</i> - óxido (2), senecionina <i>N</i> -óxido (3) e rutina (4) nos extratos de <i>C. spectabilis</i> associados com as taxas de mortalidade dos nematoides.....	65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1</b>	<b>SOJA (<i>GLYCINE MAX</i>)</b> .....	11
<b>1.2</b>	<b>NEMATOIDES DA SOJA</b> .....	12
1.2.1	<i>Heterodera glycines</i> .....	12
1.2.2	<i>Meloidogyne javanica</i> .....	13
1.2.3	A Fitoquímica e o Controle de Nematoides .....	14
<b>1.3</b>	<b>CROTALARIA L.</b> .....	16
1.3.1	Toxicidade de <i>Crotalaria spectabilis</i> .....	17
1.3.2	Métodos de análise fitoquímica de compostos ativos de <i>Crotalaria</i> .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	23
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>CROTALARIA SPECTABILIS</i></b> .....	24
3.2.1	Extratos EtOH:H <sub>2</sub> O 80% (v/v) .....	24
3.2.2	Extratos Alcalinos NaHCO <sub>3</sub> 5% (m/v) .....	25
<b>3.3</b>	<b>OBTENÇÃO DE OVOS E JUVENIS (J2) DOS NEMATOIDES ESTUDADOS</b> .....	25
<b>3.4</b>	<b>ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE SUCEPTIBILIDADE DE NEMATOIDES EM EXTRATOS DE <i>C. SPECTABILIS</i></b> .....	27
<b>3.5</b>	<b>APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL</b> .....	28
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISE DOS EXTRATOS POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS</b> .....	29
3.6.1	Preparo das Amostras .....	29
3.6.2	Métodos CLAE-UV/DAD .....	29
3.6.3	Métodos CLAE-EM/EM .....	30

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup></b> .....	31
4.1.1	Escolha de Solventes Extratores.....	32
4.1.2	Avaliação do efeito nematostático .....	32
4.1.3	Avaliação do efeito nematicida .....	35
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DE CROTALARIA SPECTABILIS POR CLAE– UV/DAD</b> .....	43
4.2.1	Otimização das Condições Cromatográficas.....	43
<b>4.3</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR CLAE-EM/EM</b> .....	47
4.3.1	Monocrotalina .....	51
4.3.2	Monocrotalina <i>N</i> -óxido.....	56
4.3.3	Senecionina <i>N</i> -óxido .....	59
4.3.4	Rutina .....	62
<b>4.4</b>	<b>CORRELAÇÃO ENTRE OS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE E A COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE CROTALARIA SPECTABILIS</b> .....	65
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SOJA (*GLYCINE MAX*)

A soja (*Glycine max*) é uma planta pertencente à família Leguminosae, seus grãos são ricos em vitaminas e minerais, além de apresentar altos teores proteicos que variam entre 35 e 40%. Também são ricos em gorduras insaturadas e isoflavonas, agregando valores nutritivos para saúde humana quando empregada na alimentação (CAPRIOTTI et al., 2014). Considerada a leguminosa mais cultivada anualmente no mundo, é responsável por suprir mais de 70% das proteínas alimentares e 60% da produção de óleo desde o ano 2000 (KIM et al., 2016).

O grão de soja é classificado como o de maior destaque na movimentação do agronegócio brasileiro, sendo que de toda área de produção agrícola no país, 56,7% é destinada ao plantio de soja (CONAB, 2016). Segundo o levantamento de produção agrícola publicado pelo USDA, na safra de 2016/2017 foram produzidas 114,1 milhões de toneladas da oleaginosa no Brasil, o que coloca o país como segundo maior produtor mundial, atrás somente dos Estados Unidos, com 116,9 milhões de toneladas. No mesmo período, o Brasil exportou 54,8 toneladas de soja, sendo recentemente o maior exportador mundial (USDA, 2018).

A quantidade e a qualidade da produção de soja dependem de inúmeros fatores das quais a cultivar é susceptível, como a mudança no clima, nutrientes no solo, disponibilidade hídrica (estresse abiótico), ataque de pragas e doenças (estresse biótico) (CONAB, 2016; KIM et al., 2016).

Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2014), avaliou o impacto econômico na agricultura brasileira provocada por insetos e pragas. Em relação à soja, essa perda foi de 5% da produção anual, resultando em um prejuízo de mais de 1,5 bilhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2014). Os nematoides parasitas de plantas, estão entre as principais pragas agrícolas, e podem parasitar diversos tipos de cultivos, como batata, algodão, tomate, banana, morango, milho, soja, entre outros, causando mais de 157 bilhões de dólares em prejuízo no mundo a cada ano (CAO et al., 2015).

## 1.2 NEMATOIDES DA SOJA

Os nematoides constituem o maior grupo de animais com organismo multicelular e podem ser encontrados no solo, ambientes aquáticos, plantas e animais. Representando 80% do reino Animalia, são conhecidas cerca de um milhão de espécies que compõem o filo nematoda, quantizando em torno de  $10^8$  indivíduos por metro quadrado no planeta, sendo que aproximadamente 100 espécies de 50 gêneros estão relacionados à cultura de soja (DIAS et al., 2010; SEESAO et al., 2017; SONG et al., 2017).

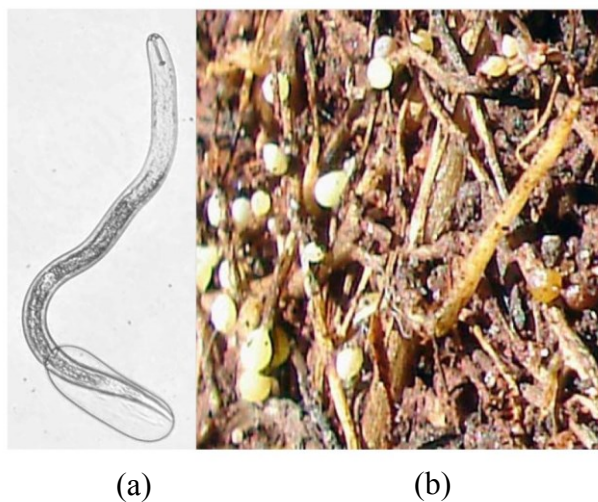
Os nematoides que parasitam animais, insetos e plantas, podem afetar a saúde de animais e seres humanos, causar desequilíbrios ambientais e, como já citado, perdas de produção agrícola que resultam em impactos econômicos negativos (SEESAO et al., 2017). Dentre os principais fitonematoides que causam danos em plantas de soja, destacam-se as espécies *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica* (DIAS et al., 2010).

O ciclo de vida das espécies *H. glycines* e *M. javanica* geralmente dura de 3 a 6 semanas, dependendo das condições ambientais. Os estágios de vida dos fitonematoides são caracterizados por ovos, larvas ou juvenis (4 estágios) e adultos, em que cada fase é determinada por mutações durante as quais a cutícula é substituída (ABAD; WILLIAMSON, 2010). Os nematoides infectam as plantas durante a segunda fase larval ( $J_2$ ), penetrando as raízes do hospedeiro com a finalidade de formar um sítio de alimentação, utilizando a planta como fonte de nutriente.

### 1.2.1 *Heterodera glycines*

*Heterodera glycines* (Figura 1) é um nematoide formador de cisto que causa, anualmente, perdas que chegam a 1 bilhão de dólares na cultura de soja somente nos Estados Unidos. Os sintomas de infecção por esse nematoide são manchas cloróticas nas folhas, necroses nas raízes e caules, além de prejudicar o desenvolvimento das vagens, sementes e o crescimento da planta como um todo. (JAIN et al., 2016; LI et al., 2016).

**Figura 1.** Nematóide juvenil J2 (a) e fêmeas de *Heterodera glycines* (b)

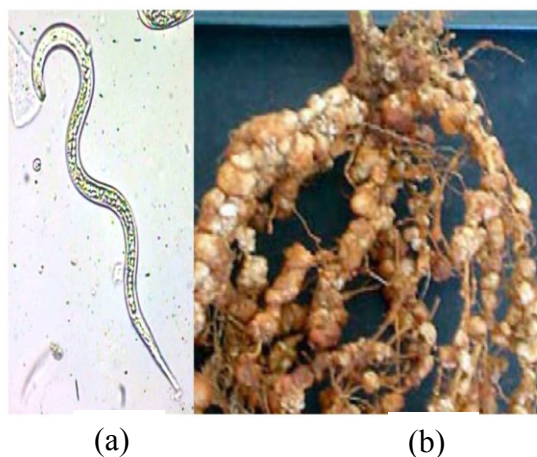


**Fonte:** Dias, 2010.

### 1.2.2 *Meloidogyne javanica*

*Meloidogyne javanica* é um nematóide formador de galhas nas raízes das plantas (Figura 2), e as perdas de produção por *Meloidogyne* spp. são de aproximadamente 70 bilhões de dólares no mundo todo, por ano. As plantas de soja contaminadas apresentam manchas amareladas e, dependendo da população de nematóide que o solo contém, reboleiras nas raízes. Caso a planta se desenvolva ao ponto do florescimento da soja, nota-se o abortamento das vagens e amadurecimento prematuro da planta (CABONI et al., 2012; DIAS et al., 2010).

**Figura 2.** Nematóide Juvenil de *Meloidogyne javanica* (a) e reboleiras formadas nas raízes de soja (b).



**Fonte:** Dias, 2010.

Os nematoides parasitas de plantas são a maior fonte de estresse biótico experimentado por plantas e são muito difíceis de controlar. Todos os endoparasitas sedentários estabelecem associações íntimas com as plantas hospedeiras, manipulando assim aspectos biológicos fundamentais das células vegetais (MIYARA et al., 2015). Sendo assim, uma das alternativas para auxiliar o controle de nematoides é a análise fitoquímica de plantas antagonistas a fim de identificar compostos com atividade nematotóxica.

### 1.2.3 A Fitoquímica e o Controle de Nematoides

A fitoquímica é definida como o estudo de constituintes químicos de espécies vegetais, sendo que as análises preliminares podem indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes da matéria vegetal. Na busca por compostos com bioatividade, são necessários ensaios envolvendo reações específicas com a finalidade de selecionar, isolar e determinar a estrutura dos metabólitos de interesse (SIMÕES et al., 2010).

As práticas de controle de fitonematoides integram a utilização de cultivares resistentes, controle biológico, a rotação de cultura com plantas antagonistas e nematicidas químicos (SIMÕES et al., 2010). A fitoquímica é um campo de estudo em crescimento que pode ser empregada em estratégias de controle de nematoides a partir da interação desses com metabólitos

secundários de plantas, buscando compostos repelentes, atrativos, estimulantes, inibidores e nematotóxicos (CHITWOOD, 2002).

Ishrat Naz e colaboradores (2016) citaram os principais grupos de metabólitos com potencial para o controle de nematoides parasitas de plantas, que incluem alcaloides, flavonoides, taninos, óleos essenciais, glicosídeos, esteroides e saponinas. Diferentes famílias de plantas, como Meliaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, entre outras, têm sido utilizadas como antifúngica, antibactericida, inseticida e antinematóide (NAZ et al., 2016).

As plantas antagonistas são as comumente utilizadas como consórcio ou rotação de culturas para o controle de nematoides parasitas, uma vez fornecerem compostos que diminuam as populações de nematoides, e também agregam matéria orgânica e fixação de nitrogênio para o solo (MIAMOTO et al., 2016).

Os compostos naturais que demonstram efeitos nematicidas, morte de nematoides, podem servir de modelo para a síntese química de compostos ativos amigáveis ao meio ambiente, já que grande parte destes metabólitos secundários são mais seguros para os seres humanos e o meio ambiente do que os nematicidas tradicionais. Alguns exemplos de nematicidas tradicionalmente utilizados são o brometo de metila, que tem propriedades prejudiciais à camada de ozônio, e produtos à base de carbamatos, como Aldicarb®, cujo o princípio ativo é o 2-metil-2(metiltio)propanalO-(N-metilcarbomol)oxima, que é tóxico para mamíferos, seres humanos e para o ambiente (CHITWOOD, 2002; KEARN et al., 2014). Algumas plantas que apresentam efeito nematicida são: as sementes de *Azadirachta indica* (neem), usadas como inseticidas (principalmente para *M. incognita*) devido à presença de limonoides; o *Pennisetum glaucum* (milheto) reduz a população de *H. glycines*, porém favorece o aumento da população de *M. javanica* e *P. brachyurus*; a *Brachiaria decumbens* (braquiaria) atua na diminuição de *H. glycines* e *M. javanica*, e não tem efeito sobre *P. brachyurus*; a *Crotalaria juncea* e *C. ochroleuca* têm efeitos nematicidas, mas não em todos os nematoides da soja; e a *Crotalaria spectabilis*, que por sua vez, é uma das únicas plantas que tem efeito nematicida sobre a maioria dos nematoides da soja. (OKA, 2010).

### 1.3 CROTALARIA L.

A *Crotalaria* é um gênero da família Fabaceae, composto por aproximadamente 700 espécies que estão distribuídas em regiões de clima tropical e subtropical do mundo, sendo a África o continente que possui a maior variedade de espécies. No Brasil são registradas 31 espécies nativas de *Crotalaria* e 11 espécies não nativas (FLORES; TOZZI, 2018).

O gênero *Crotalaria* é conhecido por apresentarem espécies vegetais ricas em aminoácidos não proteicos e alcaloides pirrolizidínicos, sendo esses encontrados nas folhas e nas sementes de diversas espécies desse gênero. Nas sementes, esses alcaloides estão presentes em altas concentrações e, em algumas espécies, pode conter mais de 5% de sua massa seca em alcaloides pirrolizidínicos. Dessa forma, grande parte dessas plantas é considerada tóxica e pode causar problemas para saúde de humanos e mamíferos (DE OLIVEIRA et al., 2018; FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009; MARTINEZ et al., 2014; PITANGA et al., 2011).

A indústria química e farmacêutica, objetivando novos desenvolvimentos no campo da biotecnologia e medicina, consideram estudos com plantas de *Crotalaria* promissores devido seu potencial tóxico e farmacológico, como carcinogênico e hepatotóxico, além de apresentarem propriedades antitumorais, antiespasmódicas, aglutinante, antibactericida e antiinflamatória (DE OLIVEIRA et al., 2018; HU; CHOU; ZHANG, 2017; SUN et al., 2013).

A *Crotalaria sessiliflora* é uma espécie utilizada na medicina Chinesa no tratamento de câncer de esôfago, no colo do útero e de pele, a monocrotalina é o metabólito responsável por essa ação, e devido sua elevada toxicidade, seu derivados são sintetizados, e tem parte da estrutura modificada com a finalidade de reduzir a toxicidade e manter a atividade anticancerígena (TANG et al., 2017).

A *Crotalaria pallida*, é utilizada na medicina popular no sudoeste e leste da China, suas raízes são designadas para tratamentos de tuberculose linfática, mastite (inflamação das mamas) e disenterias. As sementes dessa espécie são usadas no trato de neurastenia (enfraquecimento, perda de energia do sistema nervoso), tonturas, leucorreia e tumores. Hu e colaboradores

(2017) relataram que a *C. pallida* possui uma diversa variedade de atividades biológicas, como antiinflamatória, antimicrobiana, estrogênica e mutagênica (HU; CHOU; ZHANG, 2017)

Na agricultura, as lectinas (aminoácidos não proteicos) presentes em várias espécies de *Crotalaria* promovem a defesa contra herbívoros por meio do “*antifeeding*” e inibidores de protease, além de produzirem néctar extrafloral que atraem formigas e vespas (MARTINS et al., 2015).

O foco das *Crotalarias* na agricultura está na utilização dessas como adubo verde, na fixação de nitrogênio no solo e, particularmente, na redução de nematoides endoparasitas sedentários. A *Crotalaria juncea*, por exemplo, é extensivamente cultivada, devido seu potencial benéfico para o solo, controle de erosões, supressão de ervas daninhas e controle de nematoides.

A *Crotalaria spectabilis* é a principal espécie usada no controle de nematoides, pois é a que mais reduz a população dos nematoides de cisto e de galha, que são os parasitas de plantas mais prejudiciais às safras agrícolas (COLEGATE et al., 2012, THODEN et al, 2010).

### 1.3.1 Toxicidade de *Crotalaria spectabilis*

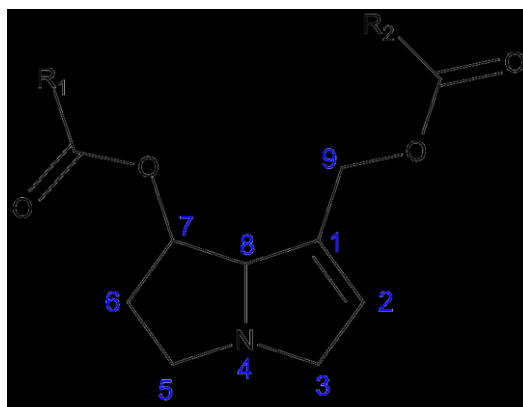
A *Crotalaria spectabilis*, Figura 3, é uma espécie nativa da Índia, também encontrada no Brasil (FLORES; TOZZI, 2018). A quantidade de alcalóides por massa seca de material vegetal está entre 0,01 – 1,52% nas folhas e entre 2,41-5,35% nas sementes, o que indica um elevado grau de toxicidade (COLEGATE et al., 2012).

**Figura 3.** *Crotalaria spectabilis* florida e com vagens.



Grande parte das espécies de *Crotalaria* estão associadas com a produção de alcaloides pirrolizidínicos, metabólitos secundários sintetizados pelas plantas para auxiliar em seus mecanismos de defesa contra herbívoros (IRMER et al., 2015). Os alcaloides pirrolizidínicos são, predominantemente, compostos por ésteres de 1-hidroximetilpirrolizinas hidroxiladas (base necina), ou seja, requerem a presença de uma ligação dupla 1,2 no anel pirrolizidínico e esterificação de grupos hidroxila em C9 ou C7 com ácidos mono ou dicarboxílicos contendo de quatro a seis átomos de carbono (ácido néxico). A Figura 4 ilustra a estrutura básica dos alcalóides pirrolizidínicos (FLETCHER et al., 2009).

**Figura 4.** Estrutura básica dos alcaloides pirrolizidínicos

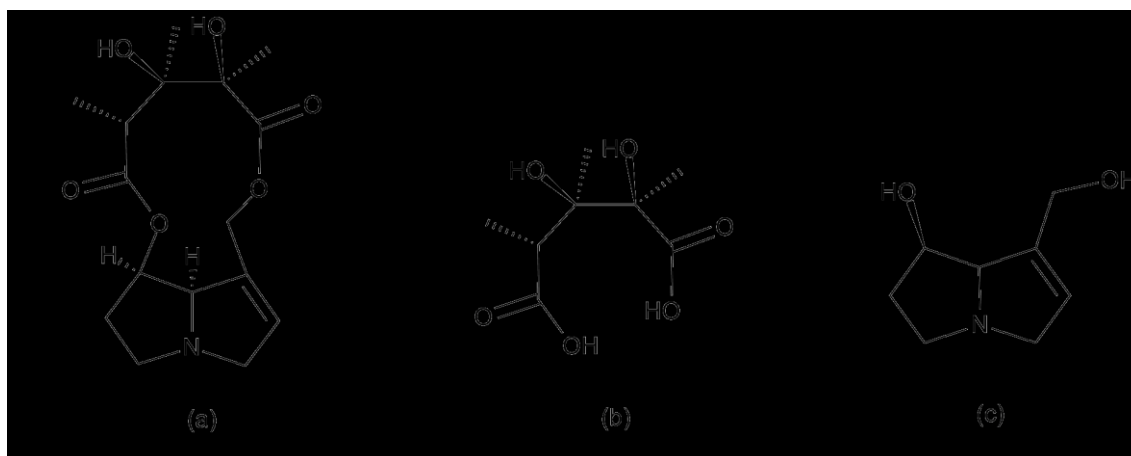


Fonte: Martinez et al., 2014.

Os alcaloides pirrolizidínicos, apresentam três principais rotas metabólicas: a hidrólise que gera bases necinas e ácidos nécicos, a *N*-oxidação para formar alcaloides pirrolizidínicos *N*-óxido e a oxidação de alcaloides pirrolizidínicos para produzir dideidro-pirrolizidinas intermediárias (YANG et al., 2017).

Os alcaloides pirrolizidínicos são substâncias com atividades tóxicas, são a fonte de toxinas mais facilmente encontradas em plantas, apesar de não serem todos que apresentam atividades tóxicas.. Os metabólitos mais tóxicos são os que contêm ésteres com ligações 1,2 de retronecinas insaturadas que podem ser utilizadas como inseticidas naturais. A monocrotalina (MCT), Figura 5 (a) é um alcalóide pirrolizidínico formado pelo ácido monocrotálico Figura 5 (b) e a base necina denominada retronecina, Figura 5 (c). A monocrotalina é considerada uma fitotoxina que pode ser obtida da *C. spectabilis* (MARTINEZ et al., 2014; RÖSEMANN; BOTHA; ELOFF, 2014).

**Figura 5.** Estrutura da (a) monocrotalina; (b) ácido monocrotálico; e (c) retronecina.

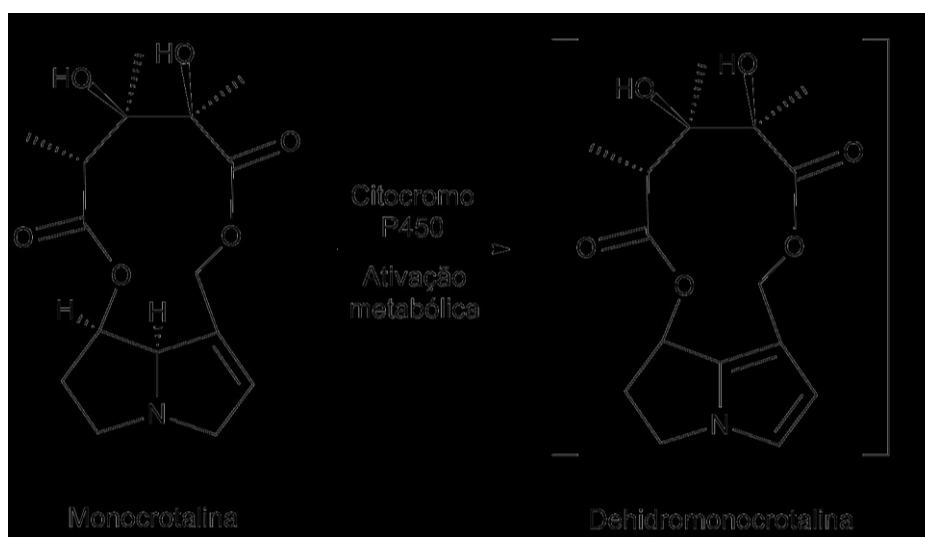


Fonte: Martinez et al., 2014.

Em seres humanos, a monocrotalina é convertida em dehidromonocrotalina (DHM) pelo citocromo P450, como representado na Figura 6, induzindo assim a toxicidade. A dehidromonocrotalina é eletrofílica e reativa, podendo se ligar a biomoléculas nucleofílicas, ou reagir com DNA e

proteínas formando proteínas e DNAs adutos (YANG et al., 2017). Além disso, devido sua alta toxicidade e reatividade, essa pode causar lesões no fígado, induzir hipertensão pulmonar e, caso entre na corrente sanguínea, afetar o coração, rins, pâncreas, pele e cérebro (YANG et al., 2011). Estudos sugerem que a LD<sub>50</sub> (dose letal para matar 50% de uma população de ratos testada) de monocrotalina foi 109 mg kg<sup>-1</sup> em uma única injeção intraperitoneal (YANG et al., 2017).

**Figura 6.** Ativação metabólica da monocrotalina pelo citocromo P450



Fonte: Yang, 2017

As espécies de *Crotalaria* têm sido usadas extensivamente como uma cultura de cobertura, pois são espécies não hospedeira para muitos nematoides parasitas de plantas. A monocrotalina, isolada da *C. spectabilis*, tem ação de suprimir alguns nematoides da soja. Contudo, não se sabe exatamente se, ao inibir esses nematoides, a planta deposita algum resíduo no solo. No entanto, sabe-se que a contaminação de seres vivos por monocrotalina, geralmente, ocorre pela ingestão de grãos, mel, chás e cereais contaminados pela substância (OKA, 2010; SAKAMOTO et al., 2017).

### 1.3.2 Métodos de análise fitoquímica de compostos ativos de *Crotalaria*

Atualmente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um dos métodos mais utilizados na análise química de compostos. Essa técnica se dá pela separação de substâncias através de propriedades físico-químicas de migração diferencial dos analitos através da fase móvel e da fase estacionária. A partir do momento que os compostos são eluídos, esses são direcionados para os detectores, que usualmente utiliza-se os detectores de absorção de radiação no UV-Vis com arranjo de fotodiodos e o espectrômetro de massas (CASS, et al. 2013).

Hu e colaboradores (2017), identificaram substâncias, basicamente flavonoides, que foram isoladas da *Crotalaria pallida*, utilizando das técnicas de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLUE-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e RMN 2D) no processo de separação e determinação estrutural dessas moléculas. Dentre as substâncias, a maioria apresentou fraca atividade anti-inflamatória, entretanto, a cropalliflavona C. apresentou atividade moderada. A atividade citotóxica também foi avaliada e o composto cropalliflavona B, se revelou moderadamente citotóxico com  $\text{IC}_{50} = 6,77 \mu\text{mol L}^{-1}$  em células MCF-7.

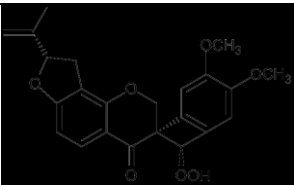
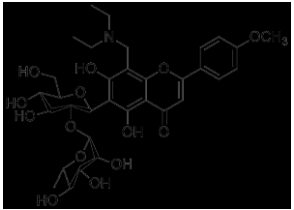
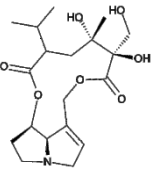
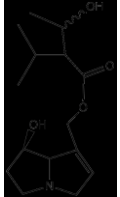
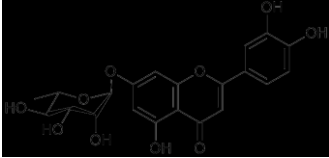
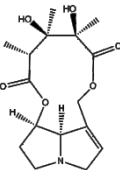
Colegate e colaboradores (2012), estudaram 23 alcaloides presentes nas folhas, sementes, caules e raízes de *Crotalaria juncea*, que foram isolados e quantificados através de análises por CLAE-EM e caracterizadas por RMN, a substância encontrada em maior quantidade nas raízes, folhas e caules foi a junceína e nas folhas de *C. juncea*, a isohemijunceína B e C. Essa espécie também é reconhecida por auxiliar no controle de fitonematoides devido à presença de alcaloides pirrolizidínicos em sua composição.

Duas isopropenil-dihidrofuranóisoflavonas isoladas de *Crotalaria lachnophora*, foram identificadas através de CLAE-UV e CLAE-EM/EM e elucidadas por RMN 1D e 2D. Essas substâncias foram testadas em ensaios de atividade antimicrobiana e foi obtido resultado positivo para *E. coli*, a substância mais ativa foi a luteolina-7-O- $\alpha$ -rhamnosida (AWOUAFACK et al., 2011).

Flores e colaboradores (2009) extraíram alcaloides pirrolizidínicos de vinte e oito espécies diferentes de *Crotalaria*s e analisaram por CG-EM

Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas – CG-EM, entre elas a *Crotalaria spectabilis*, na qual está presente a monocrotalina. As estruturas das substâncias presentes em diferentes espécies de *Crotalaria*, relatadas na literatura estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Substâncias encontradas em diferentes espécies de *Crotalaria*

Susbtância	Estrutura	Espécie	Refência
Cropalliflavona B		<i>Crotalaria pallida</i>	(Hu et al., 2017)
Cropalliflavona C		<i>Crotalaria pallida</i>	(Hu et al., 2017)
Junceina		<i>Crotalaria juncea</i>	(Colegate, 2012)
Isohemijunceina		<i>Crotalaria juncea</i>	(Colegate, 2012)
luteolina-7-O- $\alpha$ -rhamnosida		<i>Crotalaria lachnophora</i>	(Awouafack, 2011)
Monocrotalina		<i>Crotalaria spectabilis</i>	(Flores, 2009)

Apesar da literatura relatar alguns trabalhos sobre espécies de *Crotalaria*, os estudos sobre a composição química da *Crotalaria spectabilis* ainda é muito escasso, e tendo em vista sua importância na economia do Brasil, é a principal espécie plantada entre safras da soja para o combate de nematoides, é de suma importância a identificação das substâncias responsáveis pelo efeito nematicida/nematostático apresentado por essa espécie.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química e a capacidade de ação nematostática e/ou nematicida de extratos da espécie *Crotalaria spectabilis* em busca de substâncias bioativas, a fim de desenvolver um bioproduto para o controle de nematoides nas culturas de soja (*Glycine max*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e identificar os compostos com potencial bioativo a partir de folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis*;
- Avaliar por meio de ensaios *in vitro* os extratos quanto à capacidade de supressão dos nematoides da soja *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*;
- Gerar informações sobre compostos naturais extraídos de *C. spectabilis* com potencial para o desenvolvimento de produto com propriedades nematicidas e/ou nematostáticas.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os materiais vegetais utilizados nos estudos foram obtidos de diferentes ambientes. As folhas foram provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação, enquanto as sementes derivaram de plantas cultivadas em campo. Cada local foi escolhido devido à necessidade de grandes quantidades relativas de material natural de qualidade para realização dos ensaios *in vitro* de susceptibilidade de nematoides aos extratos, além das análises cromatográficas.

As plantas de *Crotalaria spectabilis* foram cultivadas na unidade da EMBRAPA Soja, Londrina, Paraná, em vasos plásticos de 5 L, contendo solo natural (não esterilizado), sob condições de casa de vegetação, umidade de

60-70% e temperatura de 28 °C. Após as plantas atingirem a fase adulta (aproximadamente noventa dias), as folhas foram coletadas manualmente, secas em estufa (40 °C) por 24 h, trituradas em triturador FAK-CLASSE I-IPX1 até obtenção de pó fino, armazenadas em sacos plásticos e refrigeradas a -13 °C ao abrigo da luz, para posterior utilização.

As sementes de *C. spectabilis* foram obtidas a partir de plantas cultivadas no campo a lanço em 26/02/2016, em uma área de 325 m<sup>2</sup>, latossolo vermelho-amarelo e textura arenosa (infestada pelos nematoides *M. incognita* e *P. brachyurus*) na área experimental Estância Água Rica (22°39'23" e 50°20'51"), em Assis-SP. A coleta foi feita manualmente na data de 22/07/2016 e o material foi transportado para unidade da EMBRAPA Soja em Londrina, Paraná. A triagem foi realizada, para separação das sementes, que foram armazenadas em envelopes de papel pardo.

### **3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *CROTALARIA SPECTABILIS***

#### **3.2.1 Extratos EtOH:H<sub>2</sub>O 80% (v/v)**

Os extratos hidroalcológicos de folhas de *C. spectabilis* foram obtidos através de uma mistura contendo 800 mL de etanol (grau de pureza 99,99%, JTbaker) e 200 mL de água ultrapura. A mistura de solventes foi adicionada a um liquidificador industrial com 100 g de folhas de *C. spectabilis*, e processadas por 1 minuto (extração a frio). As soluções foram transferidas para frascos âmbar à temperatura ambiente e permaneceram em repouso por 24 h. Os extratos foram filtrados em filtros Whatmann ( $\varnothing=240$ mm) e submetidos à rotaevaporação (Rotavapor R124-BÜCHI®) em banho ultratermostático até 43 °C para evaporação da fração alcoólica do solvente. O volume de extrato restante foi congelado em freezer à -13 °C e liofilizado. O mesmo procedimento foi feito para extração hidroalcoólica de sementes de *C. spectabilis* (SIMÕES et al., 2010). As massas dos extratos liofilizados foram, de 2,895 g para folhas e 5,230 g para sementes.

### 3.2.2 Extratos Alcalinos NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v)

A solução extratora foi preparada adicionando-se 50g de hidrogenocarbonato de sódio de grau analítico (Synth) à quantidade suficiente de água ultra-pura para completar 1 L de solução. Nessa solução adicionou-se 100 g do material vegetal seco e triturado sob as mesmas condições citadas na seção 3.2.1, sendo realizada, então, uma extração a frio. A solução permaneceu ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 24 h. Os extratos foram filtrados em filtros Whatmann ( $\varnothing=240\text{mm}$ ) e os pHs foram ajustados para os valores entre 7,0 – 7,2 com adição da solução de ácido clorídrico (0,1 mol L<sup>-1</sup>). Assim, os extratos foram congelados em freezer a -13 °C e liofilizados. As massas obtidas de extratos liofilizados foram 6,267 g para folhas e 44,980 g para o de sementes.

### 3.3 OBTENÇÃO DE OVOS E JUVENIS (J2) DOS NEMATOIDES ESTUDADOS

Esta etapa experimental foi realizada no Laboratório de Nematologia da Embrapa Soja, com o auxílio do Dr. Waldir Pereira Dias e sua equipe. Para obter o inóculo puro, cada espécie de nematoide foi multiplicada de forma isolada em cultivares de soja susceptíveis a *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em casa de vegetação. O tempo de inoculação procede de acordo com seu ciclo de vida: 28 dias para *H. glycines* e 45 dias para *M. javanica*. Para a extração dos ovos, foi realizado um procedimento específico para cada espécie de nematoide, empregando métodos baseados pelos seguintes autores:

- Bonetti e Ferraz (1981) - *Meloidogyne javanica*: as raízes de *Glycine max* (soja) infestadas com essa espécie de nematoide foram lavadas em água corrente, cortadas em pedaços pequenos e trituradas em liquidificador por 30s com solução de hipoclorito 0,5% em quantidade suficiente para cobrir as raízes. A suspensão obtida foi passada por peneiras de 200 (75  $\mu\text{m}$ ) e 500 (26  $\mu\text{m}$ ) mesh. O material retido na peneira de 500 mesh foi retirado com água e transferido para tubos Falcon com adição de 1 cm<sup>3</sup> de caulim para centrifugação por 5 minutos

e 2000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado adicionou-se uma solução de sacarose (400 g de açúcar para 750 mL de água). O sedimento foi resuspenso pela agitação do tubo, e a mistura obtida foi novamente submetida à centrifugação por 1min nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi vertido na peneira de 500 mesh e lavado com água. O material da peneira de 500 mesh contendo ovos de *M. javanica* foi recolhido com água em um recipiente de vidro.

- Dias e colaboradores (1998) - *Heterodera glycines*: As raízes de soja infestadas com essa espécie de nematoide foram retiradas cuidadosamente, lavadas sob jato de água forte e a suspensão foi coletada em recipientes com capacidade de 20 L. O material resultante da lavagem passou por tamis de 20 mesh (840 µm) onde ficaram retidos os resíduos grosseiros que foram descartados, o material foi então passado por uma peneira de 100 mesh (149 µm) em que se depositaram-se as fêmeas e cistos que foram esmagados com um tubo de ensaio, expondo os ovos que foram recolhidos na peneira de 500 mesh (26 µm). Esses foram recolhidos com uma solução de sacarose  $454 \text{ g L}^{-1}$  e a solução foi centrifugada por 1min na rotação de 2000 rpm. O sobrenadante final foi passado por uma peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para remoção da sacarose, e a suspensão de ovos foi recolhida com água destilada.

Após a extração dos ovos, esses foram colocados em câmaras de eclosão, e os nematoides juvenis e adultos foram obtidos, segundo o método de Rios (1990).

### 3.4 ENSAIOS *IN VITRO* DE SUCEPTIBILIDADE DE NEMATOIDES EM EXTRATOS DE *C. SPECTABILIS*

Os experimentos foram baseados no método adaptado de Wiratno e colaboradores (2009), e consistiu em expor as amostras contendo de 100 a 150 indivíduos J2 das espécies de nematoides por mL de suspensão aos extratos de *C. spectabilis* nas concentrações finais de 5,0; 10,0 e 20,0 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando água destilada como controle. As amostras foram avaliadas após dois momentos:

- Exposição: Os nematoides juvenis presentes em 2,0 mL de suspensão foram expostos a 2,0 mL de extratos e incubados por 24h, a 25°C ao abrigo da luz. Após esse período, a mobilidade dos mesmos foi avaliada, foi feita a quantificação de indivíduos móveis/imóveis (efeito nematostático) em câmara de Peter's. Após essa etapa, as amostras foram filtradas em filtro  $\varnothing=0,45\mu\text{m}$  e submetidas ao ensaio de recuperação.
- Recuperação: O material retido no filtro, (contendo os nematoides juvenis) foi suspenso no mesmo volume com água destilada (4,0 mL) e mantido sob as mesmas condições de incubação do ensaio de exposição. Após mais 24 h, os juvenis foram novamente quantificados em Câmara de Peter's, onde foram avaliadas as suas condições morfológicas, segundo Rocha e colaboradores (2017), para considerar os indivíduos mortos (efeito nematicida).

O tempo total para realização dos ensaios *in vitro* foi de 48 h, em que cada concentração de extrato foi testada em triplicata e os resultados apresentados em porcentagem de mortalidade ao final das 48h de experimento. A porcentagem de mortalidade foi calculada através da Equação 1, em que é considerado o número de indivíduos (J2) totais e o número de indivíduos (J2) mortos (ROCHA et al., 2015).

$$(\%)Mortos = \frac{n \text{ indivíduos mortos}}{n \text{ total indivíduos}} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

### 3.5 APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL EXPERIMENTAL

Em busca da otimização do ensaio para obtenção da melhor resposta de porcentagem de mortalidade de nematoides dos experimentos *in vitro*, foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$ , sendo que as variáveis qualitativas escolhidas foram: parte da planta, solvente extrator e espécie de nematoide em dois níveis (Tabela 2). Variou-se a parte da planta (folhas e sementes de *C. spectabilis*), o solvente extrator [EtOH 80% (v/v) e NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v)] e, por fim, a espécie de nematoide (*Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*), como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Fatores e níveis do planejamento fatorial  $2^3$

Fatores/ Níveis	(-1)	(+1)
(1) Parte da Planta	Folhas	Sementes
(2) Solvente extrator	EtOH 80% (v/v)	NaHCO <sub>3</sub> 5% (m/v)
(3) Espécie de nematoide	<i>M. javanica</i>	<i>H. glycines</i>

Neste caso, o planejamento fatorial consta de 8 experimentos, que estão apresentados na Tabela 3. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

**Tabela 3.** Distribuição de ordem normal para planejamento fatorial  $2^3$  para os ensaios “*in vitro*” de extratos de *C. spectabilis*.

Ensaio	Fator (1)	Fator (2)	Fator (3)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Os dados resultantes dos experimentos foram analisados no software *Statistica* 10.0, por meio da análise de variância (ANOVA), superfícies de resposta, gráficos de Pareto.

### 3.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 3.6.1 Preparo das Amostras

As amostras analisadas em CLAE-EM/EM, foram preparadas na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, solubilizadas em ACN:H<sub>2</sub>O (1:1 V:V) e centrifugadas por 3 min em rotação de 10.000 rpm em centrífuga Eppendorf® Minispin®. Os sobrenadantes foram transferidos para vials e analisados.

#### 3.6.2 Métodos CLAE-UV/DAD

Para uma avaliação prévia do perfil químico, os extratos de *C. spectabilis*, foram analisados por CLAE-UV/DAD em cromatógrafo líquido prominence Shimadzu®, equipado com bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20AHT e módulo de comunicação CBM-20.

Uma coluna C<sub>18</sub> Zorbax Eclipse® (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) foi utilizada como fase estacionária e o sistema de solventes para análise do perfil cromatográfico das amostras consistiu de uma mistura de H<sub>2</sub>O (A) e ACN (B), ambos com 0,1% V/V de ácido fórmico, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ° C. As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>, solubilizadas em ACN:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) e filtradas em membrana de 0,22 µm.

Os métodos de eluição otimizados para avaliação cromatográfica dos quatro extratos de *C. spectabilis* estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Métodos otimizados para as análises dos extratos de *Crotalaria spectabilis* por CLAE-UV e CLAE-EM/EM

Método 1		Método 2		Método 3	
Folhas (NaHCO <sub>3</sub> )		Folhas e Sementes (EtOH:H <sub>2</sub> O)		Sementes (NaHCO <sub>3</sub> )	
t (min)	%B	t (min)	%B	t (min)	%B
0	5	0	5	0	5
2,5	5	2,5	5	8	5
26,5	100	26,5	70	53	35
				60	65
				75	75

\* B = Acetonitrila enriquecida com 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

Os cromatogramas foram registrados, e os espectros de UV dos picos individuais foram monitorados na faixa de comprimento de onda de 190-400 nm e o comprimento de onda ( $\lambda$ ) que apresentou melhor resolução e intensidade de picos foi escolhido para análise, sendo esse o  $\lambda = 280$  nm.

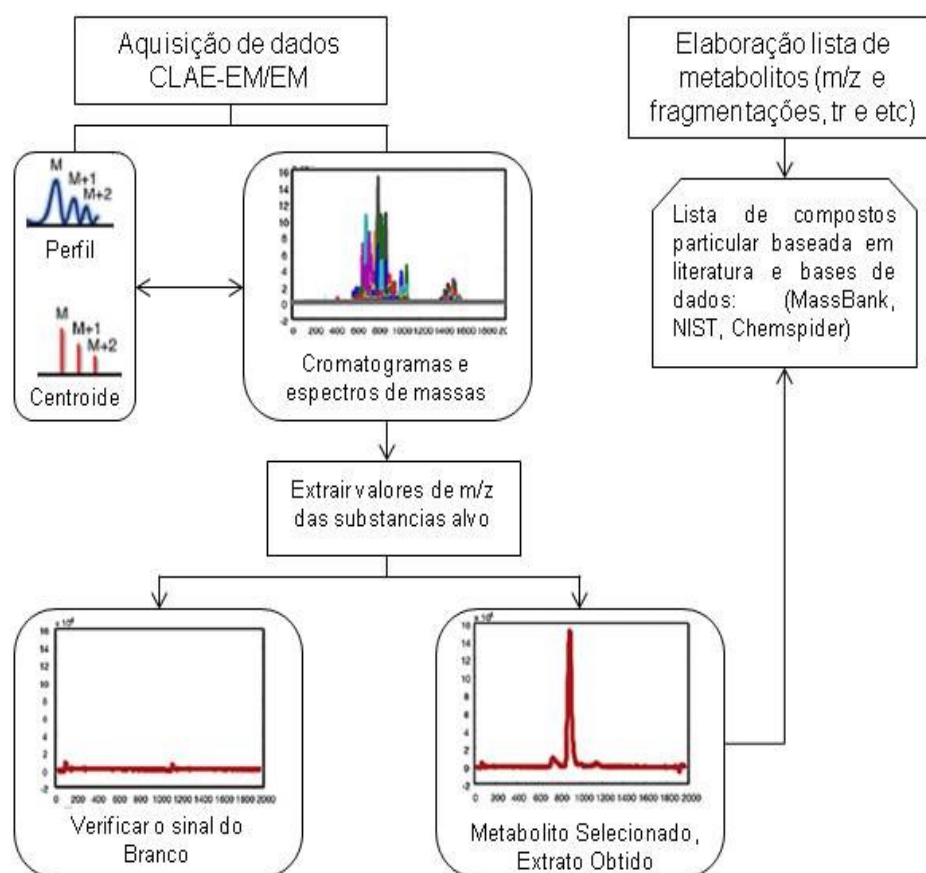
### 3.6.3 Métodos CLAE-EM/EM

Após otimizadas as condições cromatográficas por CLAE-UV/DAD, os extratos de *C. spectabilis* foram analisados em CLAE Shimadzu® acoplado ao Espectrômetro de Massas Amazon SL Bruker® com fonte de ionização *electrospray* (IES) e analisador *ionTrap*. As análises foram realizadas em modo positivo e negativo, com fragmentação até MS3, faixa de íons detectada de 50-1200, e energia de ionização de 50 V. O software Bruker Compass DataAnalysis 4.3® foi utilizado para a análise dos dados.

O esquema representado na Figura 7, aborda o método de desreplicação dos espectros, a fim de identificar as substâncias presentes no extrato, sem prévio isolamento experimental. Este método de análise fitoquímica de substâncias consiste basicamente, na aquisição, processamento, e interpretação de dados a partir de um banco de dados particular gerado com base em referências bibliográficas e/ou a partir de bases como MassBank, Chempider, PubChem, NIST, NuBBEDB, etc. (GORROCHATEGUI et al., 2016; TOHGE; FERNIE, 2009).

As análises do presente trabalho, se deram com base no esquema representado, inicialmente em busca de metabolitos alvo e posteriormente buscando identificar substâncias que se mostrarem mais intensas nos cromatogramas obtidos por CLAE-MS/MS, devido à escassez de estudos sobre esta espécie vegetal.

**Figura 7.** Esquema representativo para análise fitoquímica de compostos.



**Fonte:** Gorrochategui et al., 2016.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup>

O planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi aplicado para avaliar o efeito nematostático e nematicida dos quatro extratos de *C. spectabilis* testados em três diferentes concentrações, sendo que foram selecionados os 3 fatores: (1)

parte da planta, (2) solvente extrator e (3) espécie de nematoide, em dois níveis, inferiores (-1) estão folhas de *C. spectabilis* (1), solvente EtOH 80% (v/v) (2) e nematoide *Meloidogyne javanica* (3) e nos níveis superiores (+1) estão sementes de *C. spectabilis* (1), solvente NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) (2) e nematoide *Heterodera glycines* (3), segundo a Tabela 2 do tópico 3.5

#### 4.1.1 Escolha de Solventes Extratores

A escolha dos solventes extratores foi baseada nas propriedades dos compostos que desejava-se extrair. A maioria dos alcaloides tem caráter alcalino, a presença de um par de elétron disponível no átomo de nitrogênio confere esse caráter básico. O grau de basicidade, entretanto, dependerá da estrutura e localização de outros grupos funcionais. Feitas essas considerações, empregou-se em meio alcalino (pH~8,6) com solução de NaHCO<sub>3</sub>, a fim de evitar ou diminuir a extração de alcaloides pirrolizidínicos, e verificar se os extratos apresentavam atividade nematocida na ausência de monocrotalina (SIMÕES et al., 2010). A extração básica foi utilizada também devido a possibilidade da obtenção de saponinas, que segundo Chitwood (2002) e Naz e colaboradores (2016), fazem parte dos metabólitos quimicamente ativos que auxiliam no controle de nematoides.

Também foi utilizada uma solução etanol 80% como solvente extrator, pois a mistura hidroalcoólica possibilita a extração de diversos grupos de metabólitos, com diferentes graus de polaridade, como os heterosídeos, sendo uma das misturas de solventes mais utilizadas em análises fitoquímicas (SIMÕES et al., 2010).

#### 4.1.2 Avaliação do efeito nematostático

As respostas dos experimentos para avaliação da atividade nematostática dos nematoides que foram expostos aos extratos por 24 h são apresentados na Tabela 5, essa apresenta a distribuição dos experimentos segundo o planejamento, as concentrações avaliadas e as médias da porcentagem de mortalidade com desvio padrão.

**Tabela 5.** Distribuição de ordem normal para planejamento fatorial  $2^3$  e as respostas dos ensaios *in vitro* para extratos de *C. spectabilis*.

Ensaio	Fator (1)	Fator (2)	Fator (3)	Médias imobilidade (%)			
				Controle	5,0 mg mL <sup>-1</sup>	10,0 mg mL <sup>-1</sup>	20,0 mg mL <sup>-1</sup>
1	-1	-1	-1	4,21 ±3,65	82,09±1,64	89,38±1,34	78,64±15,22
2	+1	-1	-1	7,84±2,19	99,69±0,54	98,00±1,05	57,37±37,08
3	-1	+1	-1	1,61±2,00	99,66±0,58	99,09±0,85	96,02±5,46
4	+1	+1	-1	29,55±2,12	33,17±2,76	32,27±4,29	62,54±5,93
5	-1	-1	+1	16,84±5,61	88,12±8,28	87,71±4,71	73,63±26,39
6	+1	-1	+1	36,40±6,09	100,00±0,00	98,62±1,62	66,24±30,02
7	-1	+1	+1	2,13±1,11	97,80±0,99	97,71±0,33	97,60±0,93
8	+1	+1	+1	14,54±2,43	95,69±2,36	98,23±1,17	98,98±0,73

A análise de variância foi aplicada para os experimentos de efeito nematostático para concentrações de 5,0; 10,0 e 20,0 mg mL<sup>-1</sup>. Para os extratos na concentração de 5,0 e 10,0 mg mL<sup>-1</sup> a significância dos resultados não pôde ser avaliada pois ocorreu falta de ajuste no modelo estudado. Contudo, podemos notar a partir dos dados da Tabela 5 que o efeito de paralisação do nematoide para grande maioria destes extratos deu-se entre 80-100%.

Para os extratos na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup> a análise de variância foi significativa, os dados referentes a essa análise estão apresentados na Tabela 6. A significância foi confirmada pelo teste F de Snedecor, nele o valor de  $F_{cal}$  (apresentado na Tabela 6) deve ser maior que  $F_{crit}$  (dado da literatura, tabela de distribuição de F de Snedecor) a certo nível de confiança. Assim, o  $F_{crit} = 4,49$  a 95% de confiança, comparando-o com o valor calculado pela análise de variância, temos que somente a variável, solvente extrator é significativa pois o  $F_{cal} > F_{crit}$ , essa informação pode ser confirmada pelo gráfico de Pareto apresentado na Figura 8.

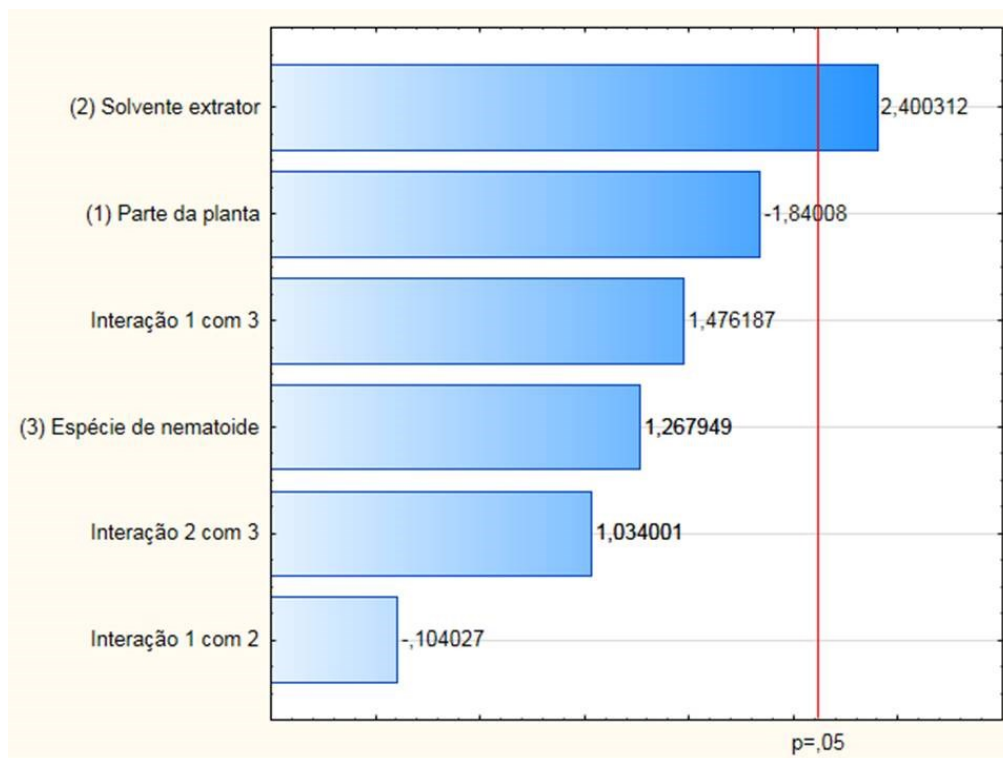
**Tabela 6.** Análise de variância para os ensaios de atividade nematostática com os extratos de *C. spectabilis* na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>

ANOVA					
Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F <sub>cal</sub>	valor-p
(1) Parte da planta	1384,51	1	1384,51	3,385894	0,084382
(2) Solvente extrator	<b>2355,91</b>	<b>1</b>	<b>2355,908</b>	<b>5,761495</b>	<b>0,028901</b>
(3) Espécie de nematoide	657,395	1	657,395	1,607694	0,222957
1 por 2 (Efeito)	4,43	1	4,425	0,010822	0,918440
1 por 3 (Efeito)	891,06	1	891,057	2,179127	0,159303
2 por 3 (Efeito)	437,18	1	437,185	1,069158	0,316512
Falta de ajuste	164,92	1	164,92	0,403317	0,534359
Erro puro	6542,49	16	408,906		
Total	12437,89	23			

SQ: Soma Quadrática; Gl: Graus de liberdade; MQ: Média Quadrática; F: F de Snedecor (calculado); valor – p: Valor de prova.

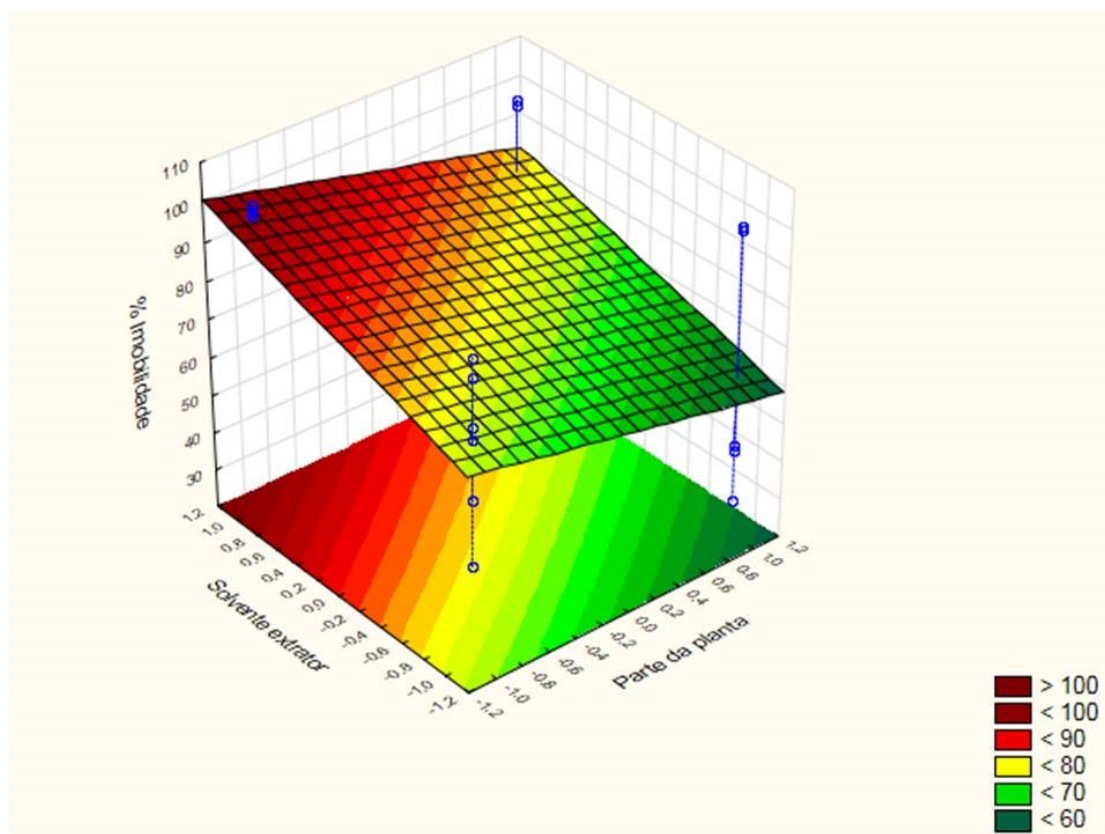
\* Os valores destacados em vermelho são considerados significativos segundo os resultados do teste ANOVA.

**Figura 8.** Gráfico de Pareto para o ensaio de imobilidade de nematoides (efeito nematostático) frente aos extratos de *C. spectabilis*



Ao considerar que o solvente extrator é a única variável significativa através do gráfico de Pareto, podemos associá-lo com a superfície de resposta apresentada na Figura 9, que mostra o nível ótimo para cada fator, apresentando um valor mais alto de resposta (em vermelho) para valores positivos do fator 2 (solvente extrator). Analisando a superfície de resposta podemos verificar que o solvente  $\text{NaHCO}_3$  5% (m/v) tem uma resposta maior de imobilidade dos nematoides, e os valores variam no intervalo de aproximadamente 70-100%. Para o solvente EtOH 80% (v/v) a taxa de imobilidade variou de 60-90%.

**Figura 9.** Superfície de resposta para ensaio *in vitro* de imobilidade de nematoides em função do solvente extrator e parte da planta



#### 4.1.3 Avaliação do efeito nematicida

As respostas dos experimentos *in vitro* para avaliação da porcentagem de mortalidade de nematoides, expostos aos extratos por 48 h, foram obtidas

através planejamento fatorial  $2^3$ , para 3 concentrações de extratos 5,0, 10,0 e 20,0 mg mL<sup>-1</sup> e o controle em água destilada, estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Distribuição experimental do planejamento fatorial  $2^3$  e respostas de porcentagem de mortalidade de nematoides

Ensaio	Fator (1)	Fator (2)	Fator (3)	Médias Mortalidade (%)			
				Controle	5,0 mg mL <sup>-1</sup>	10,0 mg mL <sup>-1</sup>	20,0 mg mL <sup>-1</sup>
1	-1	-1	-1	8,23 ±2,63	12,81±6,79	11,91±4,70	13,84±5,11
2	+1	-1	-1	12,01±1,93	12,84±7,48	14,35±7,43	12,15±2,10
3	-1	+1	-1	11,04±6,58	13,98±2,79	13,92±1,98	89,52±6,73
4	+1	+1	-1	26,69±0,60	39,53±2,89	36,48±0,52	43,57±11,70
5	-1	-1	+1	13,03±4,47	2,27±3,21	5,71±2,57	1,85±2,62
6	+1	-1	+1	28,23±3,88	67,88±4,77	57,95±5,47	43,78±1,99
7	-1	+1	+1	4,73±0,33	4,06±1,24	67,41±11,54	94,95±5,88
8	+1	+1	+1	16,81±1,45	27,64±4,73	78,83±11,08	95,95±4,39

Os resultados que, em geral, apresentaram maior efeito nematicida, foram dos extratos na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>, sendo esses os escolhidos para uma análise estatística mais extensa. Os dados obtidos dos experimentos fatoriais apresentados foram compilados no software Statistica 10.0. A significância dos resultados foi verificada utilizando-se como ferramenta a Análise de Variância (ANOVA).

Os resultados provenientes da ANOVA para os ensaios com extratos na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup> são apresentados na Tabela 8. A significância dos dados destacados em vermelho foram confirmadas pelo teste F de Snedecor, em que o valor de  $F_{cal} > F_{crit}$  para que os efeitos sejam significativos, logo verificou-se o valor de  $F_{crit}$  com 95% de confiança, sendo  $F_{crit,1,16} = 4,49$ .

**Tabela 8.** Análise de variância (ANOVA) para os ensaios de mortalidade de nematoides expostos aos extratos na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>

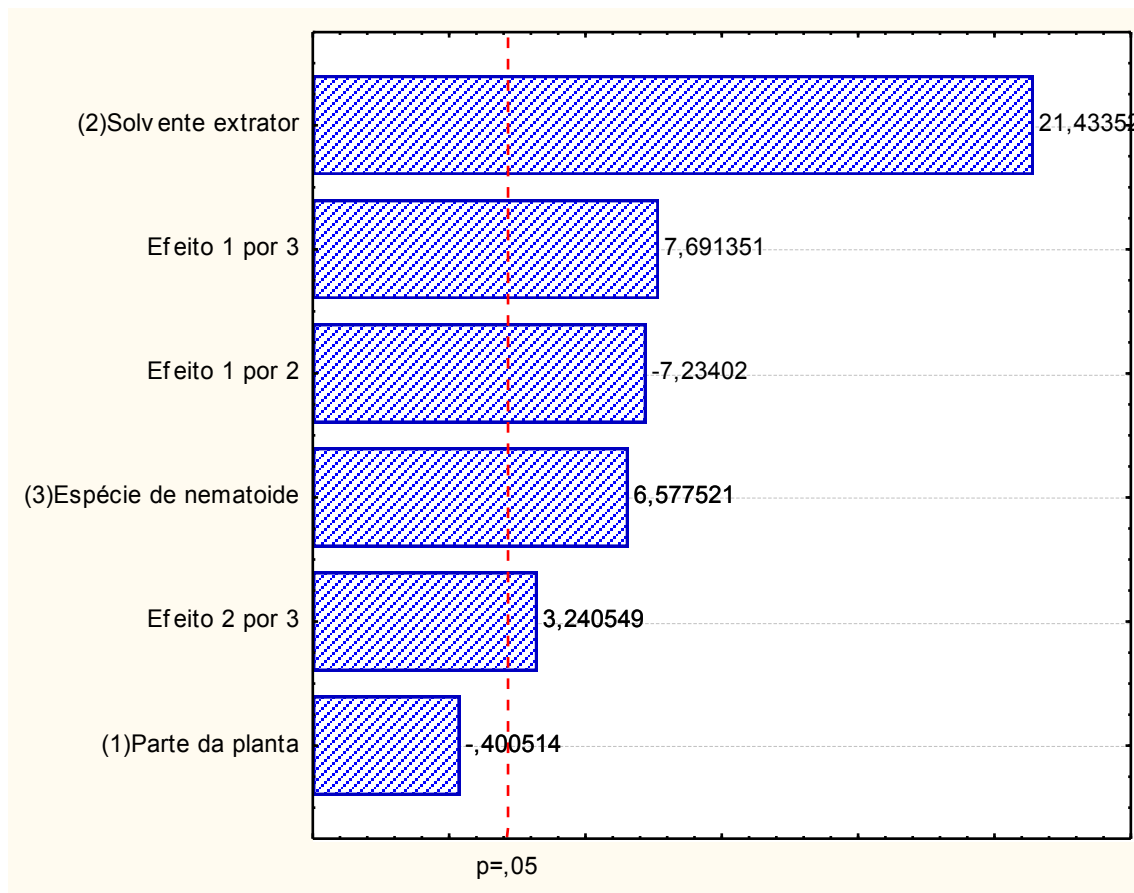
ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F<sub>cal</sub></i>	<i>valor-p</i>
(1) Parte da planta	8,34	1	8,34	0,1604	0,694075
(2) Solvente extrator	23887,41	1	23887,41	459,3957	0,000000
(3) Espécie de nematoide	2249,61	1	2249,61	43,2638	0,000006
1 por 2 (Efeito)	2721,08	1	2721,08	52,3311	0,000002
1 por 3 (Efeito)	3076,01	1	3076,01	59,1569	0,000001
2 por 3 (Efeito)	546,03	1	546,03	10,5012	0,005122
Falta de ajuste	4,15	1	4,15	0,0799	0,781063
Erro puro	831,96	16	52,00		
Total	33324,60	23			

SQ: Soma Quadrática; Gl: Graus de liberdade; MQ: Média Quadrática; F: F de Snedecor (calculado); valor – p: Valor de prova.

\* Os valores destacados em vermelho são considerados significativos segundo os resultados do teste ANOVA.

A significância dos efeitos ao nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) pode ser melhor visualizada pelo Gráfico de Pareto (Figura 10). Assim, pode-se observar que dos efeitos principais, o fator (1) parte da planta, não apresentou significância nos resultados de mortalidade de nematoides com valor  $p > 0,05$ , ou seja, não houve diferença significativa na utilização de folhas ou sementes. O fator (2) que relata o efeito do solvente extrator e o fator (3) que difere as espécies de nematoide, demonstraram significância na resposta de mortalidade com valor  $p < 0,05$ .

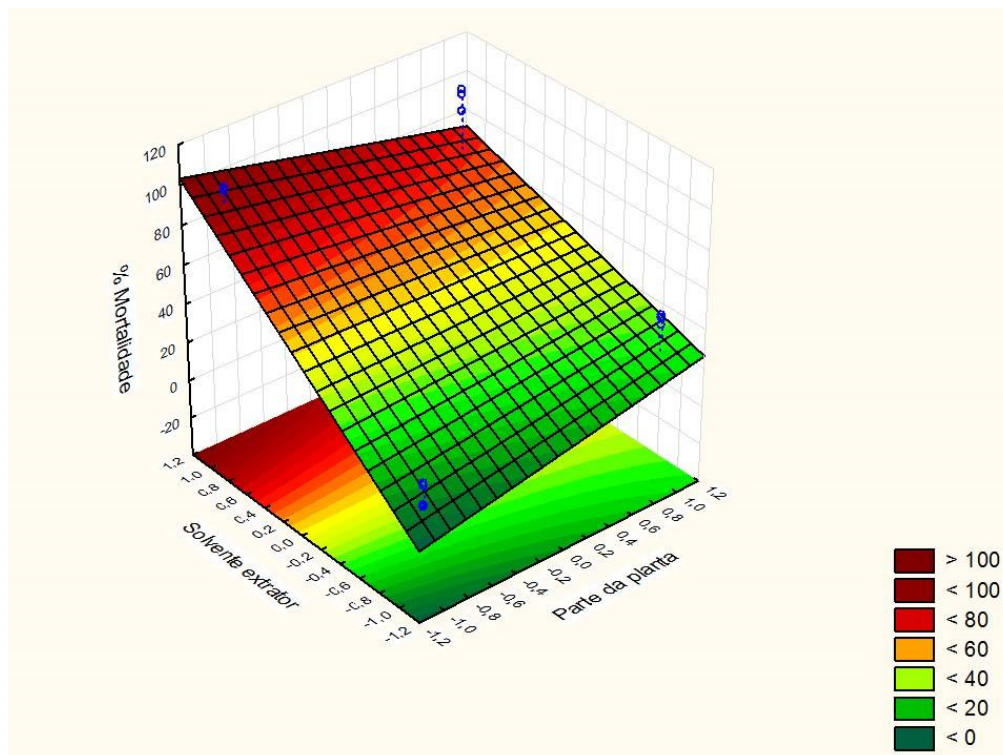
**Figura 10.** Gráfico de Pareto, gerado a partir dos resultados da ANOVA, obtidos dos ensaios de susceptibilidade de nematoides.



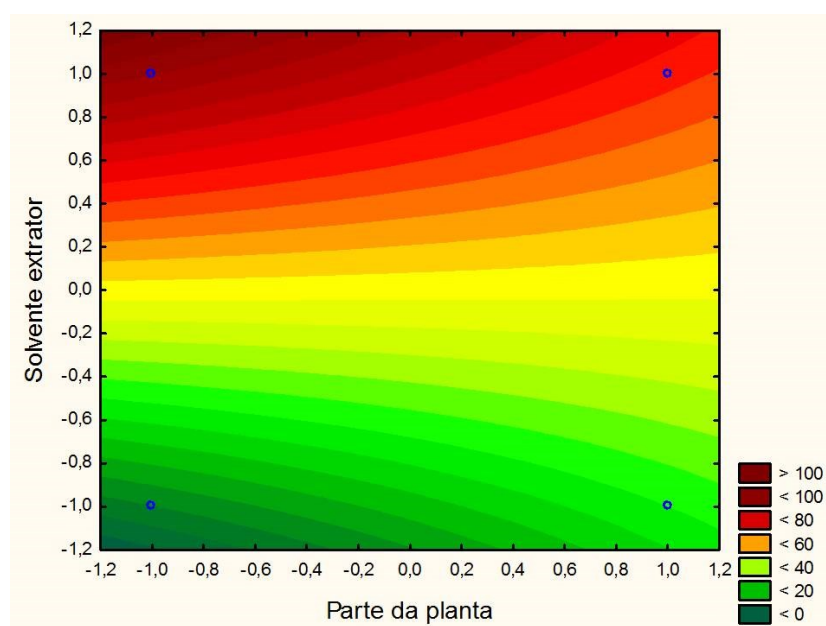
Segundo Neto, Scarminio e Bruns (2001), quando os efeitos de interação são significativos, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente, como foram obtidas significância nos efeitos de interação, deve-se avaliar o efeito de 1 com 2 (parte da planta com solvente extrator), 1 com 3 (parte da planta e espécie de nematoide, e 2 com 3 (solvente extrator e espécie de nematoide).

Com o auxílio da superfície de resposta Figura 11 e o gráfico de contorno Figura 12 podemos avaliar o efeito da interação de 1 com 2 (parte da planta com solvente extrator). Nota-se que acima de 50% de mortalidade, a influência do solvente é maior no nível superior (+), ou seja, o solvente alcalino  $\text{NaHCO}_3$  5% (m/V) tem maior significância em relação ao etanol, independente da parte da planta utilizada na extração.

**Figura 11.** Superfície de resposta para porcentagem da mortalidade de nematoides em função da parte da planta e do o solvente extrator.

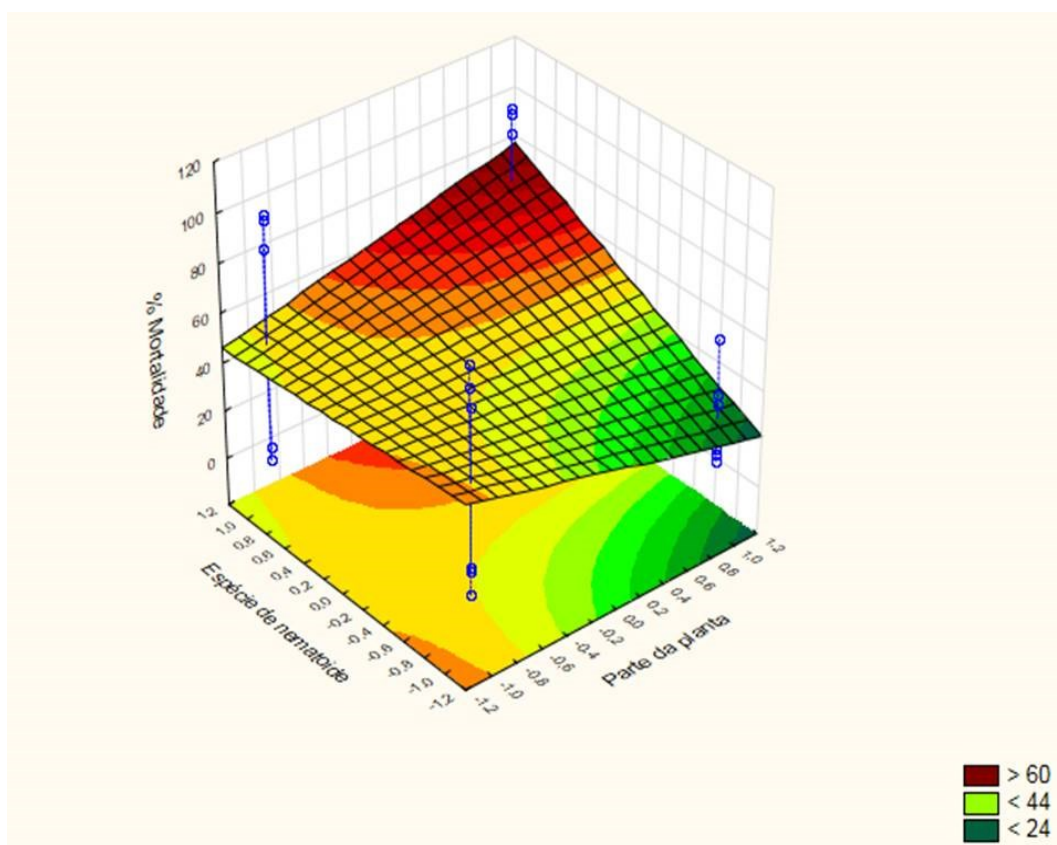


**Figura 12.** Superfície de contorno para porcentagem da mortalidade de nematoides em função da interação da parte da planta com solvente extrator.

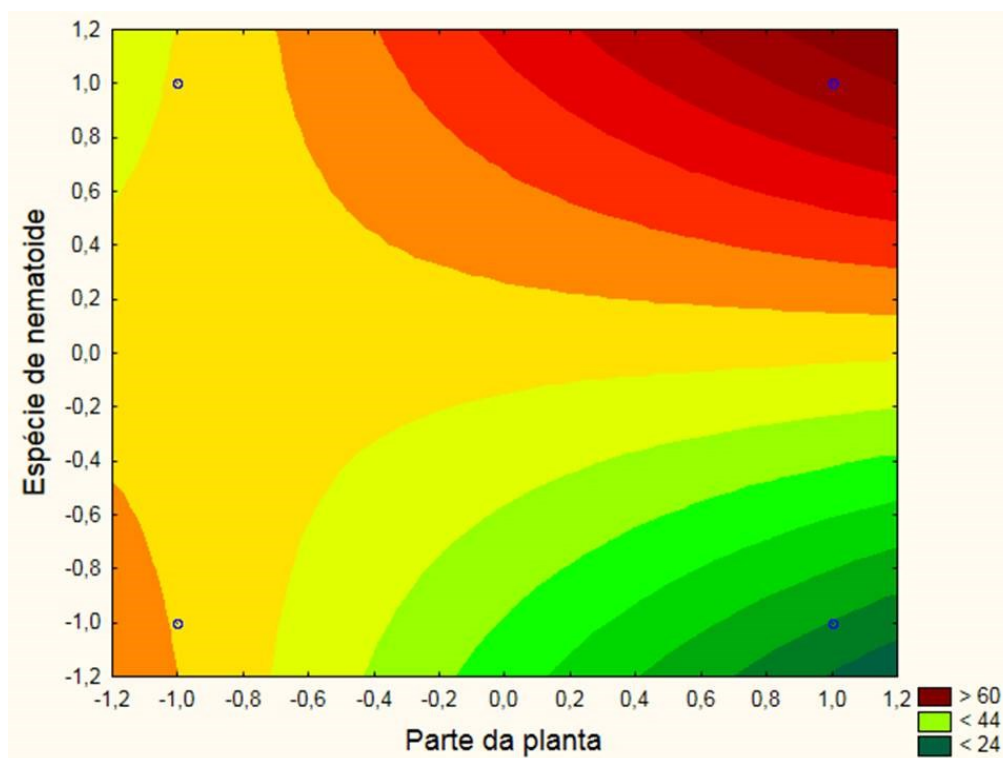


A superfície de resposta apresentada na Figura 13 e a superfície de contorno na Figura 14 mostram a maior tendência de mortalidade de nematoides para a interação de 1 com 3 (parte da planta com espécie de nematoide), esse foi o maior efeito de interação de acordo com os resultados do gráfico de Pareto na Figura 10. Ao avaliar a porcentagem de mortalidade acima de 50% verifica-se que a espécie de nematoide mais susceptível foi *Heterodera glycines* principalmente quando houve interação com os extratos de sementes de *C. spectabilis*, já com os extratos as folhas de *C. spectabilis*, a mortalidade de *H. glycines* foi maior que 44%. O nematoide *Meloidogyne javanica* apresentou taxa mortalidade entre 44 e 60% quando exposto aos extratos de folhas de *C. spectabilis*, porém, demonstrou taxas de mortalidade menores de 44% quando em contato com os extratos de sementes.

**Figura 13.** Superfície de resposta para porcentagem de mortalidade de nematoides em função da parte da planta com a espécies de nematoide.

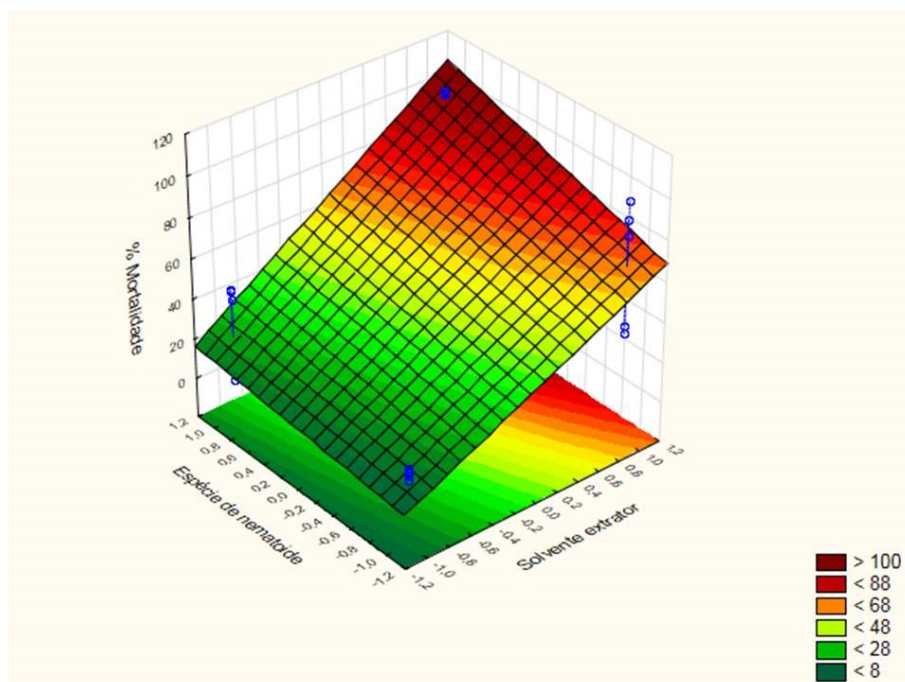


**Figura 14.** Superfície de contorno para porcentagem de mortalidade de nematoides em função da espécie de nematoide e da parte da planta.

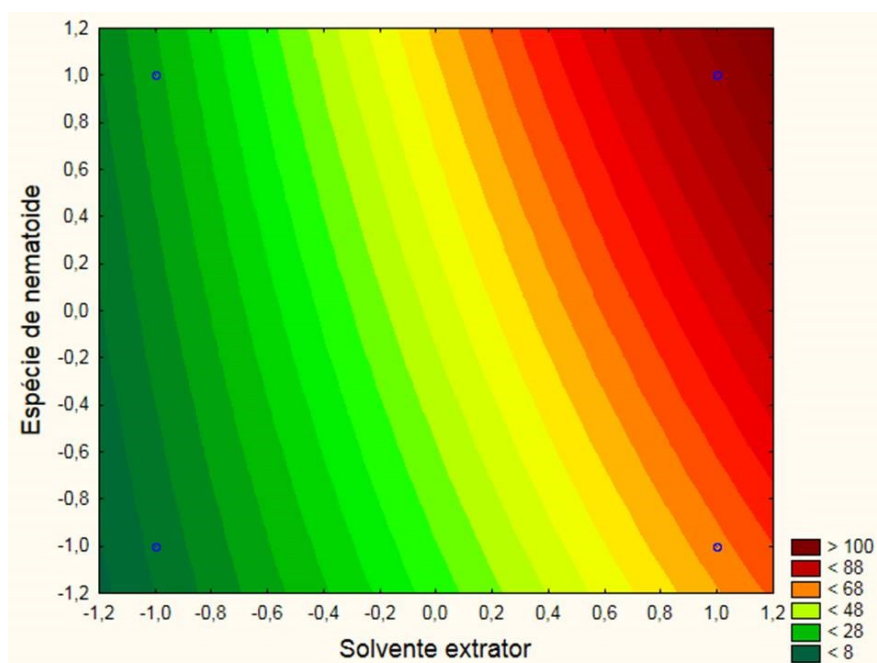


Nas Figuras 15 e 16, são apresentadas as superfícies de resposta e de contorno, respectivamente, para o efeito de interação de 2 com 3 (solvente extrator e espécie de nematoide). Nessa interação pode-se determinar que tanto o nematoide *Meloidogyne javanica* quanto *Heterodera glycines* apresentaram as maiores taxas de mortalidade quando foi utilizado o  $\text{NaHCO}_3$  como solvente extrator, sendo que *H. glycines* foi mais susceptível aos extratos com taxas de mortalidade variando de valores de cerca 48-100%, enquanto as porcentagens de mortalidade de *M. javanica* variaram de aproximadamente 30-90%. A mortalidade dos dois nematoides quando interagem com o solvente hidroalcoólico variou entre 8-48%.

**Figura 15.** Superfície de resposta para a porcentagem de mortalidade de nematoides em função da do solvente extrator e espécie de nematoide.



**Figura 16.** Superfície de contorno para porcentagem de mortalidade de nematoides em função do solvente extrator com a espécie de nematoide.



Os melhores resultados para taxa de mortalidade foram provenientes dos extratos alcalinos  $\text{NaHCO}_3$  5% (m/v) tanto de folhas como de sementes de

*C. spectabilis*, e o nematoide mais susceptível à esses extratos, de acordo com os gráficos obtidos, na concentração de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ , foi o *Heterodera glycines*. Contudo, ao considerar a taxa de mortalidade acima de 90% podemos também considerar um resultado promissor o ensaio feito com os extratos alcalinos de folhas de *C. spectabilis* exposto ao nematoide *Meloidogyne javanica*. Assim, verificou-se que o extrato alcalino de folhas de *C. spectabilis*, mostrou maior atividade para os dois nematoides avaliados.

Geralmente, a mortalidade de nematoides através da utilização da *C. spectabilis* como rotação de cultura, é atribuída na literatura pela biossíntese do metabólito secundário monocrotalina, como já citado anteriormente. Portanto, também foi realizada uma investigação fitoquímica dos extratos de folhas e sementes de *C. spectabilis* por meio técnicas de CLAE–UV/DAD e CLAE–EM/EM, em busca de outros compostos ativos que possam promover essa mortalidade.

## **4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DE *CROTALARIA SPECTABILIS* POR CLAE–UV/DAD**

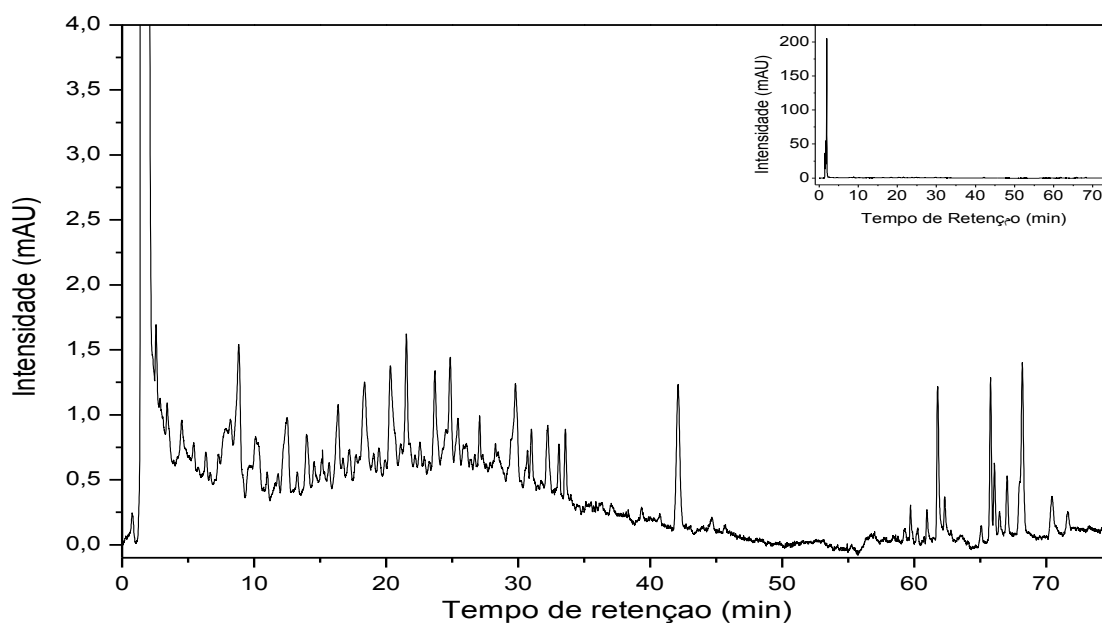
### **4.2.1 Otimização das Condições Cromatográficas**

De acordo com os métodos de extração, os perfis cromatográficos dos quatro extratos de *C. spectabilis* tiveram as condições de separação otimizadas, utilizando como fase estacionária (FE) no modo reverso uma coluna analítica  $C_{18}$ , indicada para separação de substâncias apolares e moderadamente apolares. A fase móvel (FM) utilizada deve ser mais polar que a (FE), e deve ser capaz de eluir os compostos adsorvidos na (FE), logo, foi analisada a força de eluição ( $\epsilon^0$ ) dos solventes comumente utilizados em análises cromatográficas, e a acetonitrila (ACN), com  $\epsilon^0 = 0,52$ , foi escolhida. Comparada ao metanol e ao tetrahidrofurano com  $\epsilon^0 = 0,70$  e  $0,53$  respectivamente, como FM. A ACN tem menor viscosidade que os demais quando em solução aquosa, e apresenta uma baixa absorção no UV-Vis ( $\lambda = 190 \text{ nm}$ ), além de gerar picos mais definidos, e com maior resolução (CASS et. al. 2013).

Os perfis cromatográficos dos extratos alcalinos e hidroalcoólicos de folhas e sementes de *C. spectabilis* foram obtidos por CLAE-UV/DAD e comprimento de onda escolhido para as análises foi o de 280 nm. As corridas cromatográficas foram iniciadas no modo de eluição gradiente exploratório de 5-100 %B em 26,5 minutos e, a partir desse resultado, foi ajustado o gradiente, buscando uma diminuição da taxa de ACN, o que causa diminuição da força de eluição e promove uma melhor separação dos picos cromatográficos. Os métodos otimizados para os quatro extratos estudados estão apresentados na Tabela 4, item 3.6.2.

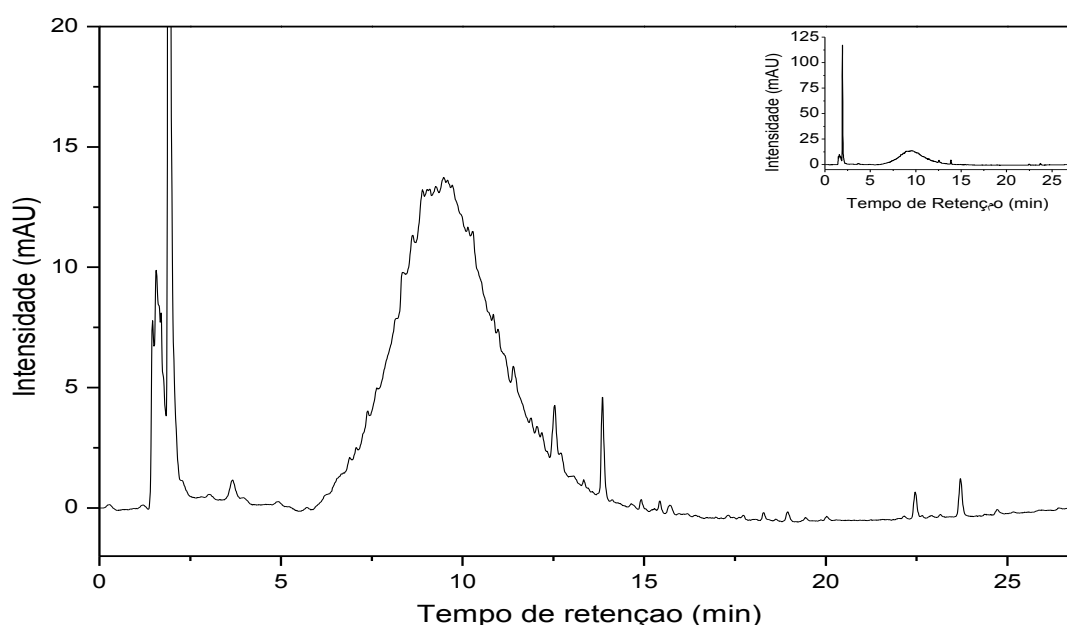
O cromatograma referente ao extrato NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) de sementes de *C. spectabilis* é apresentado na Figura 17. O método 3 (0-8 min 5 %B, aumentando de 8-53 min de 5-35 %B, até os 60 min o gradiente foi de 35-65 %B e de 60-75 min para 75 %B ), consiste do gradiente exploratório que foi utilizado como o método de separação. O perfil cromatográfico desse extrato apresentou várias bandas de diversas polaridades, a maioria está nas regiões de polaridade média e alta, foi observado baixa intensidade dos picos, porém, esses são estreitos e com boa resolução.

**Figura 17.** Cromatograma relativo ao extrato NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) de sementes de *C. spectabilis*, com detecção em  $\lambda = 280$  nm, obtido por CLAE-UV/DAD



A separação do extrato de folhas  $\text{NaHCO}_3$  foi definida pelo método exploratório de 5 -100% ACN (0,1%  $\text{HCOOH}$ ) em 26,5 min, Tabela 4, método 1, resultando no perfil cromatográfico apresentado na Figura 18. Podemos observar algumas bandas na região de média e baixa polaridade, contudo, no intervalo de 5 a 13 min ocorre um grande desvio da linha de base e, conseqüentemente, uma baixa resolução dos picos, isso pode estar associado com a presença de taninos no extrato.

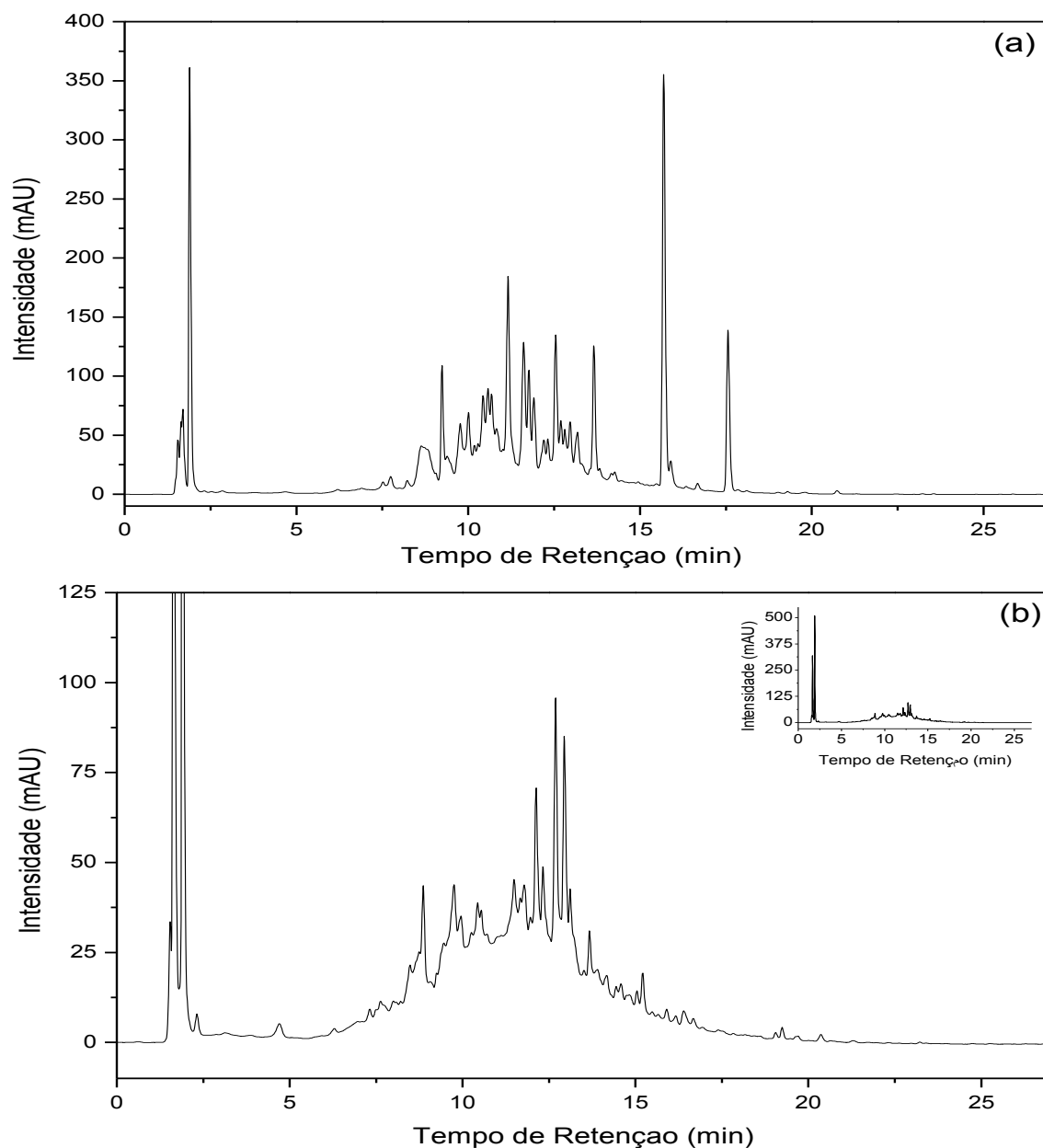
**Figura 18.** Cromatograma do extrato  $\text{NaHCO}_3$  5% (m/v) de folhas de *C. spectabilis*, obtido por CLAE-UV/DAD



A separação cromatográfica das substâncias presentes no extrato EtOH 80% (v/v) de sementes e folhas de *C. spectabilis*, se deu pelo ajuste da força de eluição dos compostos a partir do método exploratório 5– 100% B (ACN com  $\text{HCOOH}$  0,1%) em 26,5 minutos, em que a porcentagem de acetonitrila por minutos foi de  $3,58 \%B \text{ min}^{-1}$ . Levando em conta que o método não apresentou boa resolução dos picos, foi feito um ajuste na força de eluição da fase móvel buscando um menor valor de porcentagem de acetonitrila (B) por minuto, já que ao aumentar a fase aquosa e diminuir a orgânica a força de eluição diminui. Assim, o método 2, apresentado na Tabela 4, que consiste do gradiente 5 – 70%B em 26,5 minutos foi utilizado. Nesse método a porcentagem de B por minuto foi de  $2,45 \%B \text{ min}^{-1}$ , resultando nos

cromatogramas apresentados na Figura 21, na qual são apresentados em (a) extrato EtOH 80% (v/v) de sementes de *C. spectabilis*, em que as bandas cromatográficas estão em sua maioria nas regiões de média polaridade e (b) extrato EtOH 80% (v/v) de folhas de *C. spectabilis*, onde se pode notar uma pequena elevação da linha de base, que pode ser indicativo da presença de taninos ou ácidos graxos, sendo necessária uma análise de RMN com o intuito de verificar através dos valores de deslocamento, quais são as classes de substâncias apresentadas nessa banda cromatográfica.

**Figura 19.** Cromatogramas do extrato EtOH 80% (v/v) de (a) sementes e (b) folhas de *C. spectabilis* obtidos por CLAE-UV/DAD.



#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR CLAE-EM/EM

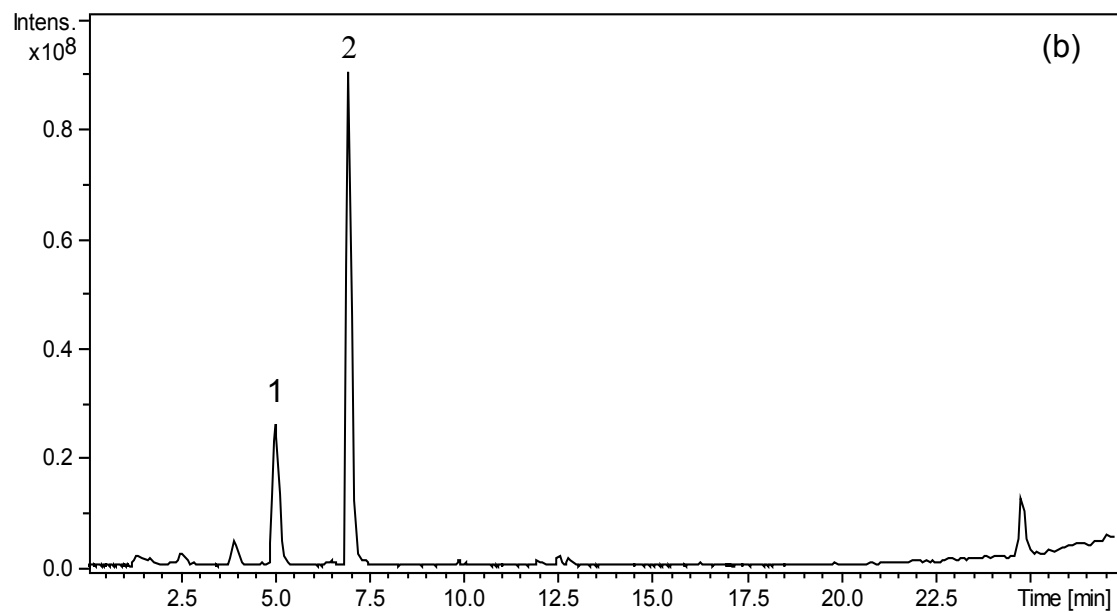
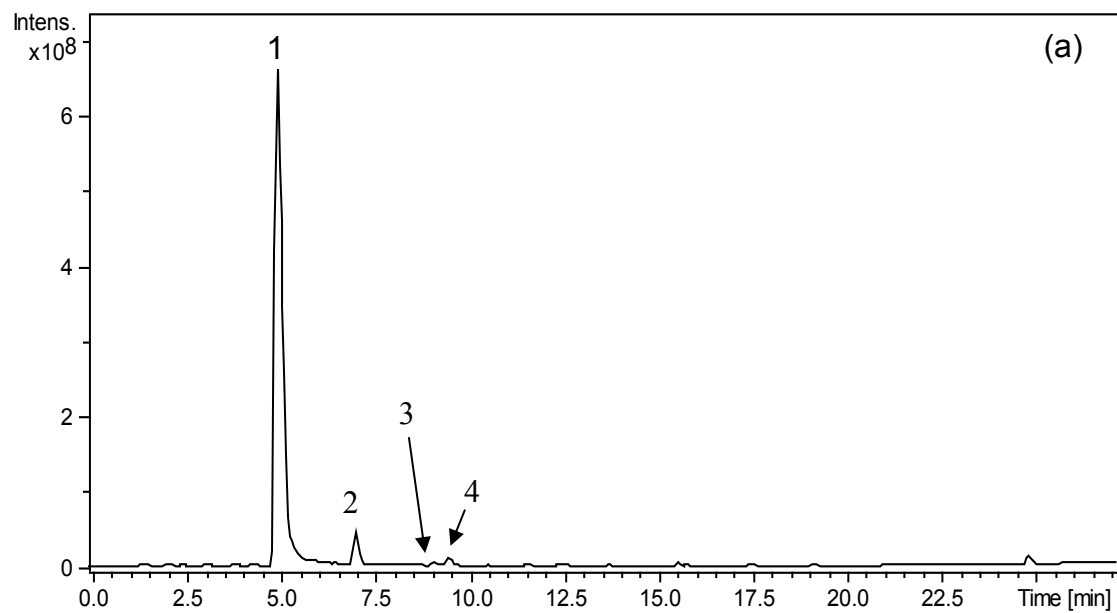
Com base na literatura da área, foram compiladas as substâncias já identificadas em diversas espécies do gênero *Crotalaria*, Tabela 9, com a razão massa carga ( $m/z$ ) dos íons, para auxiliar no reconhecimento de substâncias presentes nos extratos de folhas e sementes de *C. spectabilis*.

**Tabela 9.** Revisão da literatura de substâncias encontradas em diversas espécies *Crotalaria*

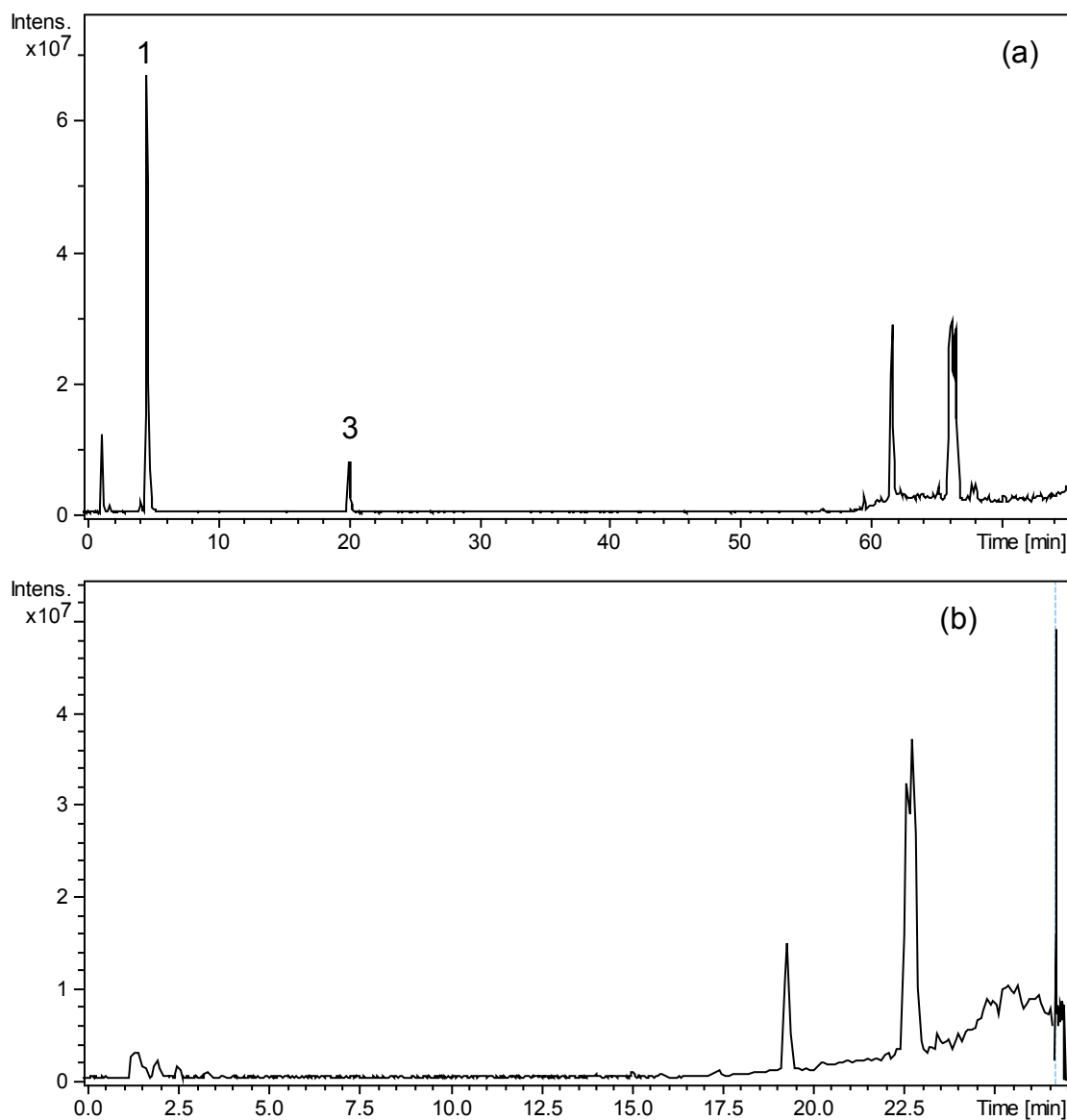
Fórmula molecular	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Substância	Referência
C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	326,1598	Monocrotalina	(ZHANG et al., 2017)
C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	156,197	Retronecina	(FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009)
C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	336,400	Senecionina	(FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009)
C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	368,398	Spectabilina	(FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009)
C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	352,399	Usaramina	(FLORES; TOZZI; TRIGO, 2009)
C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	445,1179	Cropalina A	(HU; CHOU; ZHANG, 2017)
C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub>	593,1363	Cropalina B	(HU; CHOU; ZHANG, 2017)
C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	411,1366	Cropaliflavona A	(HU; CHOU; ZHANG, 2017)
C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>14</sub>	678,2605	Cropaliflavona C	(HU; CHOU; ZHANG, 2017)
C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	195,058	Ácido ferrúlico	(HU; CHOU; ZHANG, 2017)
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449,38	Isoorientina	(DEEPPHA et al., 2014)
C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	415,386	β-sitosterol	(AYDIN; LETZEL, 2013)
C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>7</sub>	370,179	Junceína	(COLEGATE et al., 2012)
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	433,106	Vitexina	(TANG et al., 2017)
C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	353,1021	Lacnoisoflavona A	(AWOUAFACK et al., 2011)
C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	351,0862	Lacnoisoflavona B	(AWOUAFACK et al., 2011)

Para obtenção dos cromatogramas do íon total (TIC) por CLAE-EM/EM, foram utilizadas as mesmas condições apresentadas na Tabela 4, resultando nos cromatogramas, no modo de ionização positivo, exibidos na Figura 20, para o extrato EtOH 80% (v/v) de (a) sementes e (b) folhas de *C. spectabilis*, além dos cromatogramas obtidos a partir do extrato NaHCO<sub>3</sub> de sementes e folhas de *C. spectabilis*, apresentados na Figura 21.

**Figura 20.** Cromatograma de íon total do extrato EtOH 80% (v/v) de (a) sementes e (b) folhas de *C. spectabilis* obtido por CLAE-EM/EM.

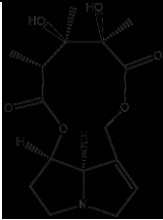
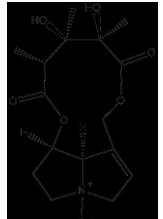
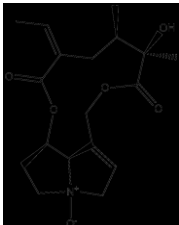
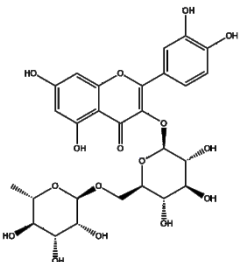


**Figura 21.** Cromatograma de íon total (TIC) do extrato  $\text{NaHCO}_3$  de (a) sementes e (b) folhas de *C. spectabilis* obtido por CLAE-EM/EM, no modo positivo.



Foram identificadas quatro substâncias nos extratos de *C. spectabilis*, sendo elas, (1) a monocrotalina, presente no extrato EtOH 80% de folhas e sementes e no extrato alcalino de sementes, (2) a monocrotalina-*N*-óxido presente nos extratos hidroalcoólicos de sementes e folhas, (3) a senecionina-*N*-óxido, que foi encontrada nos dois extratos de sementes, e (4) a rutina, identificada no extrato EtOH 80% de sementes, esses dados estão resumidos na Tabela 10.

**Tabela 10.** Substâncias identificadas nos extratos de *C. spectabilis*

N	Fórmula molecular	Susbtância	Estrutura	Massa molecular
1	$C_{16}H_{23}NO_6$	Monocrotalina		325,36
2	$C_{16}H_{23}NO_7$	Monocrotalina- <i>N</i> -óxido		341,36
3	$C_{18}H_{25}NO_6$	Senecionina- <i>N</i> -óxido		351,39
4	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Rutina		610,52

#### 4.3.1 Monocrotalina

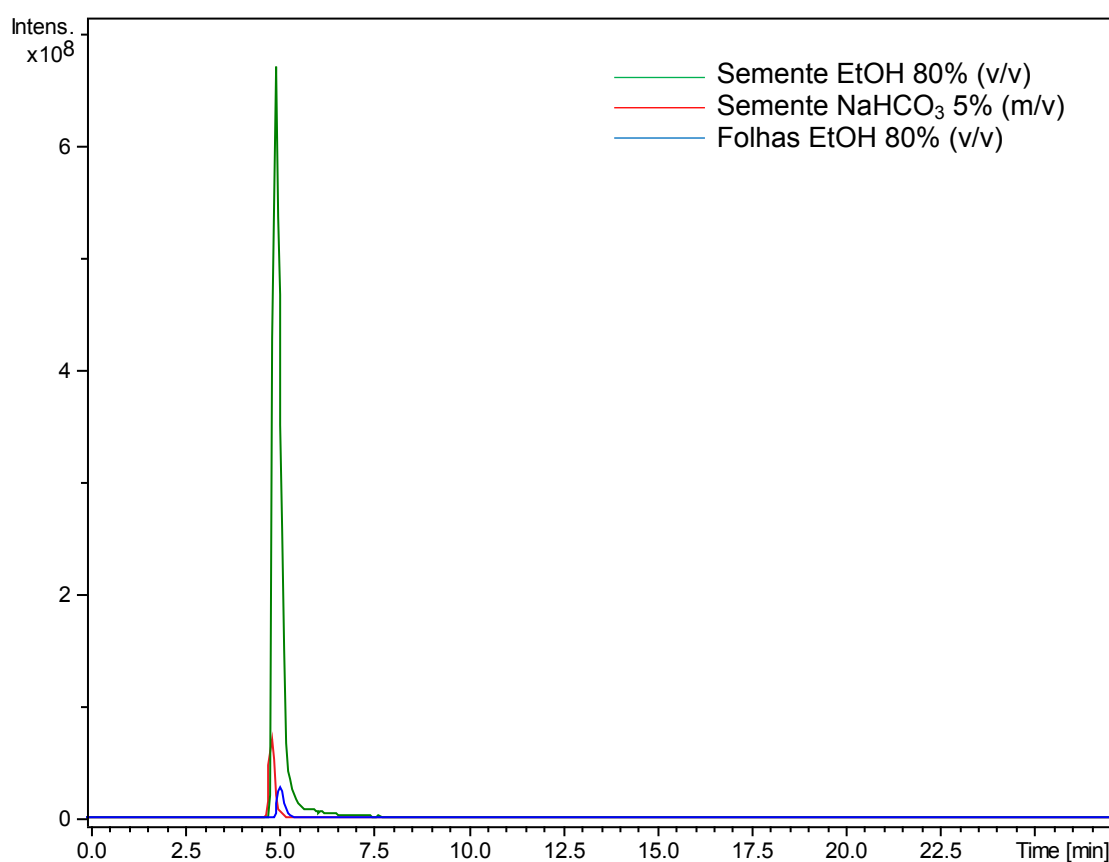
As plantas do gênero *Crotalaria* têm sido caracterizadas por serem ricas em alcaloides pirrolizidínicos. A monocrotalina é o alcaloide que tem maior destaque, na espécie *C. spectabilis*, devido seu potencial de toxicidade.

Zhang e colaboradores (2017) estudaram cinco alcaloides pirrolizidínicos provenientes da espécie *Crotalaria sessiflora* empregando UHPLC-Q-Orbitrap/MS no modo positivo. Os alcaloides identificados foram monocrotalina, retrorsina, senecionina, interriginina e o-9-angeloilretronecina. O padrão de fragmentação para a molécula monocrotalina, apresentando pelos autores são:  $[M+H]^+$  326,1586 como o íon precursor, são

correspondentes às razões  $m/z$  280,1533; 237,1351; 194,1170; 164,1065; 138,0909; 121,0811; 120,0811 e 94,0653.

Na Figura 22, pode-se observar três picos extraídos do cromatograma do íon total, a partir da razão  $m/z$  326 no tempo de retenção de aproximadamente 5 minutos em três dos extratos de *C. spectabilis* analisados.

**Figura 22.** Cromatogramas do íon de  $m/z$  326 selecionado a partir dos cromatogramas de íon total (TIC) dos extratos  $\text{NaHCO}_3$  e EtOH 80% de sementes e EtOH 80% de folhas de *C. spectabilis*.



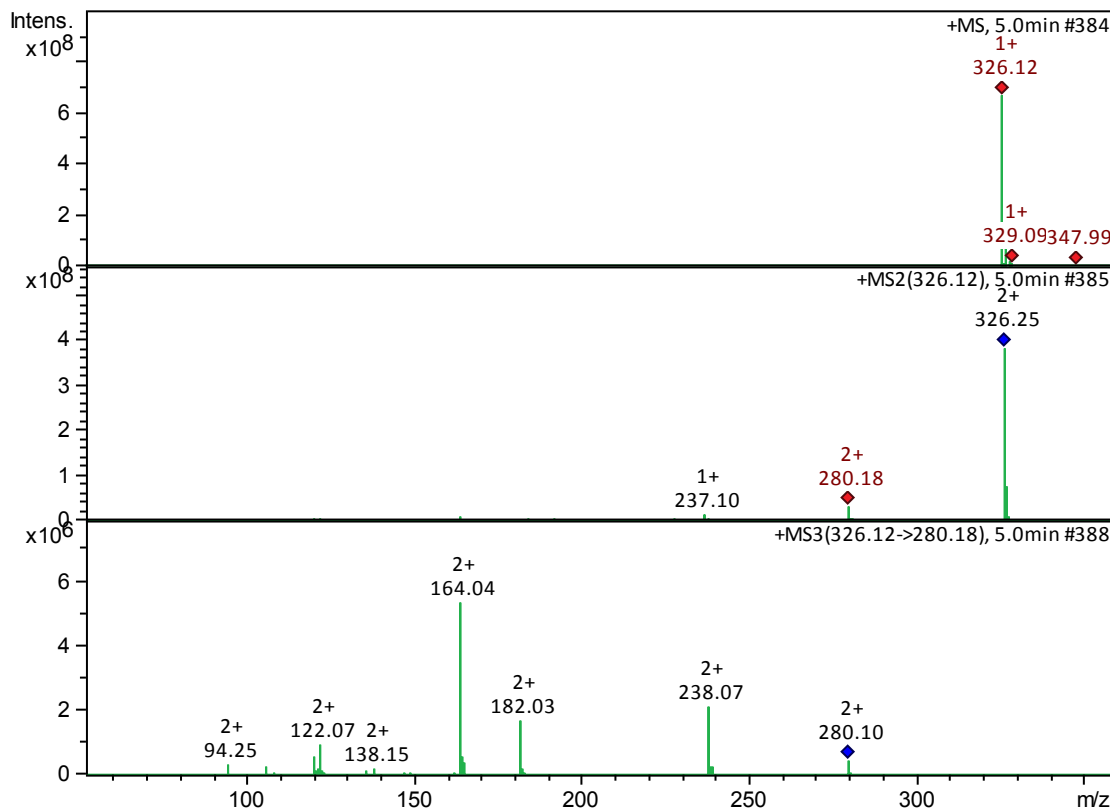
Ao analisar os cromatogramas do íon extraído  $m/z$  326, apresentado na Figura 22, podemos observar as diferenças nas intensidades dos picos. A semente é parte da planta de *Crotalaria* que apresenta maior teor de alcaloides, e pode-se notar, que a extração com o solvente etanol 80% apresenta o pico mais intenso, conforme esperado. O extrato alcalino ( $\text{NaHCO}_3$ ), escolhido com a finalidade de evitar a extração de alcaloides, não foi tão efetivo para sementes uma vez que esse íon foi observado na análise

desse extrato, ainda que em menor intensidade. Já no caso da extração alcalina das folhas mostrou-se efetiva uma vez que não foi observada a presença desse íon. Para o extrato EtOH 80% de folhas, nota-se o pico menos intenso se comparado ao extrato hidroalcoólico de sementes, confirmando que a quantidade de alcaloides nas folhas é bem menor que nas sementes desta espécie vegetal.

Para confirmar a identidade das substâncias presentes nos extratos de *C. spectabilis* foi verificado o padrão de fragmentação obtido nas análises dos extratos de modo a comparar com as fragmentações relatadas na literatura. No entanto, sabe-se que a energia de colisão pode afetar o padrão e as abundâncias relativas dos íons fragmentados, logo, é necessário propor um mecanismo de fragmentação adequado para quebra das moléculas alvos nos padrões obtidos experimentalmente (ZHANG et al., 2017).

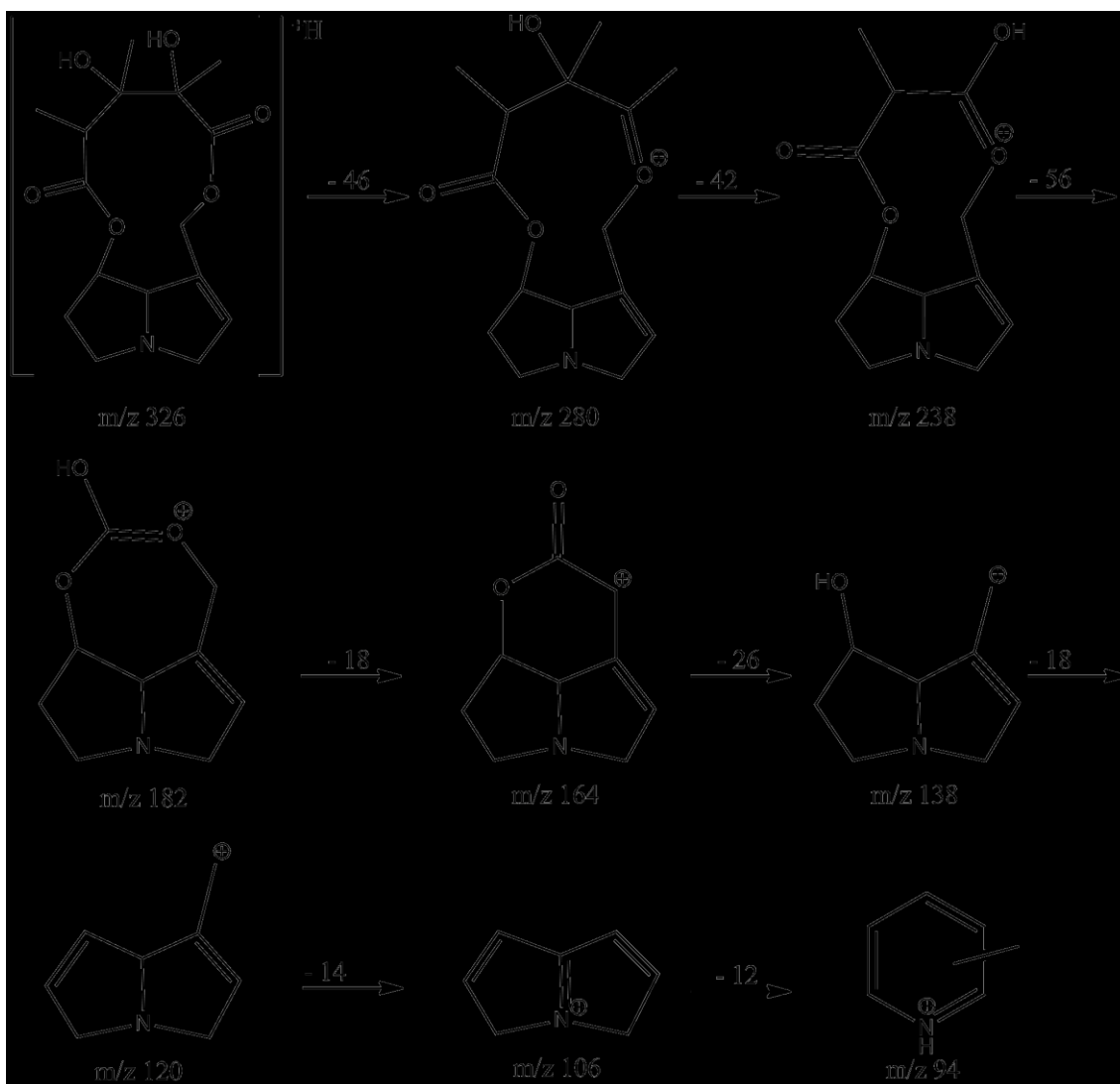
A Figura 23 mostra o espectro com os padrões de fragmentação para o íon selecionado a partir do TIC para o extrato hidroalcoólico de sementes de *C. spectabilis*. O mesmo padrão é verificado para este íon nos extratos de folhas EtOH 80% e NaHCO<sub>3</sub>, em que nota-se que o íon referente à molécula protonada,  $[M+H]^+$  = 326,12, corresponde ao valor de referência da monocrotalina.

**Figura 23.** Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM com o padrão de fragmentação para o íon de  $m/z$  326,12 do extrato EtOH 80% de sementes de *C. spectabilis*.



Segundo o padrão de fragmentação, Figura 23, o íon molecular (MS) com  $m/z$  326,12, característico da monocrotalina, é fragmentado em (MS2) no íon  $m/z$  280,18. A fragmentação em MS3 obtida experimentalmente tem como precursor o íon fragmentado  $m/z$  280,10. Os íons observados para essa fragmentação foram  $m/z$  238,07; 182,03; 164,04; 138,15; 122,07; 120,05; 106,11 e 94,25. A formação desses fragmentos foi proposta baseada em descrições na literatura (AVULA et al., 2018); Modesto-Costa, L. et al., (2018); Neuner-Jehle, N. et al., (1965) e Zhang, W. et al., (2017)) e ilustrada na Figura 24, sendo possível confirmar o padrão de fragmentação e a identificação do metabólito monocrotalina.

**Figura 24.** Proposta de fragmentação do íon  $m/z$  326,12 a partir da estrutura do metabólito monocrotalina.



A Tabela 11 apresenta uma melhor visualização das informações de fragmentação dos íons obtidos experimentalmente, e dos íons relatados na literatura.

**Tabela 11.** Relação de fragmentos de monocrotalina obtidos experimentalmente por CLAE-EM/EM e fragmentos relatados na literatura \*

Fragmentos de monocrotalina obtidos experimentalmente	Fragmentos de monocrotalina relatado na literatura
326,12	326,1586
280,18	280,1533
238,07	X
237,10	237,1351
182,03	194,1170
164,04	164,1065
138,15	138,0909
122,07	121,0811
120,05	X
94,25	94,0653

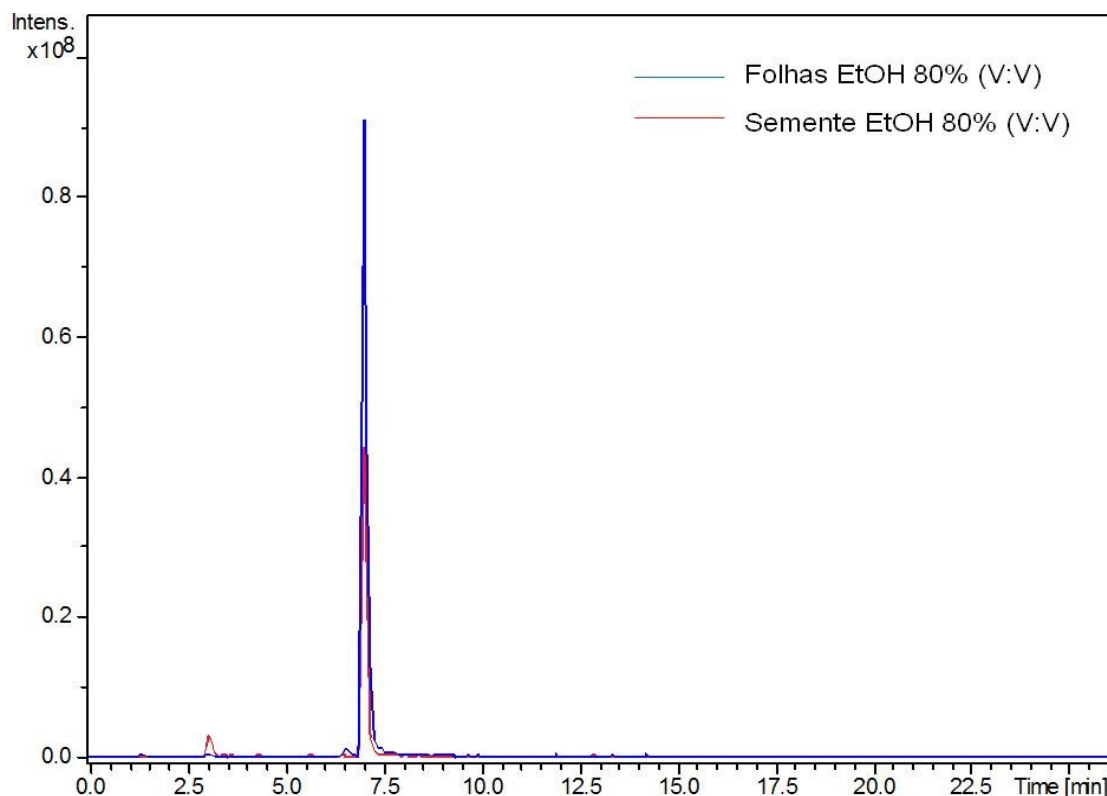
\* Segundo Zhang e colaboradores (2017)

#### 4.3.2 Monocrotalina *N*-óxido

Os alcaloides pirrolizidínicos *N*-óxido ocorrem de forma natural nas plantas e podem coexistir com seu alcaloide pirrolizidínico correspondente e estar presente em quantidades iguais, maiores ou menores. Os *N*-óxidos podem também ter atividade tóxica, porém, geralmente, menor que seu alcaloide pirrolizidínico precursor, devido a necessidade de uma redução metabólica (RUAN et al., 2012).

Na Figura 25, está representado o cromatograma do íon total para o íon selecionado com razão massa/carga de 342, presente nos extratos EtOH 80% (v/v) de folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis*.

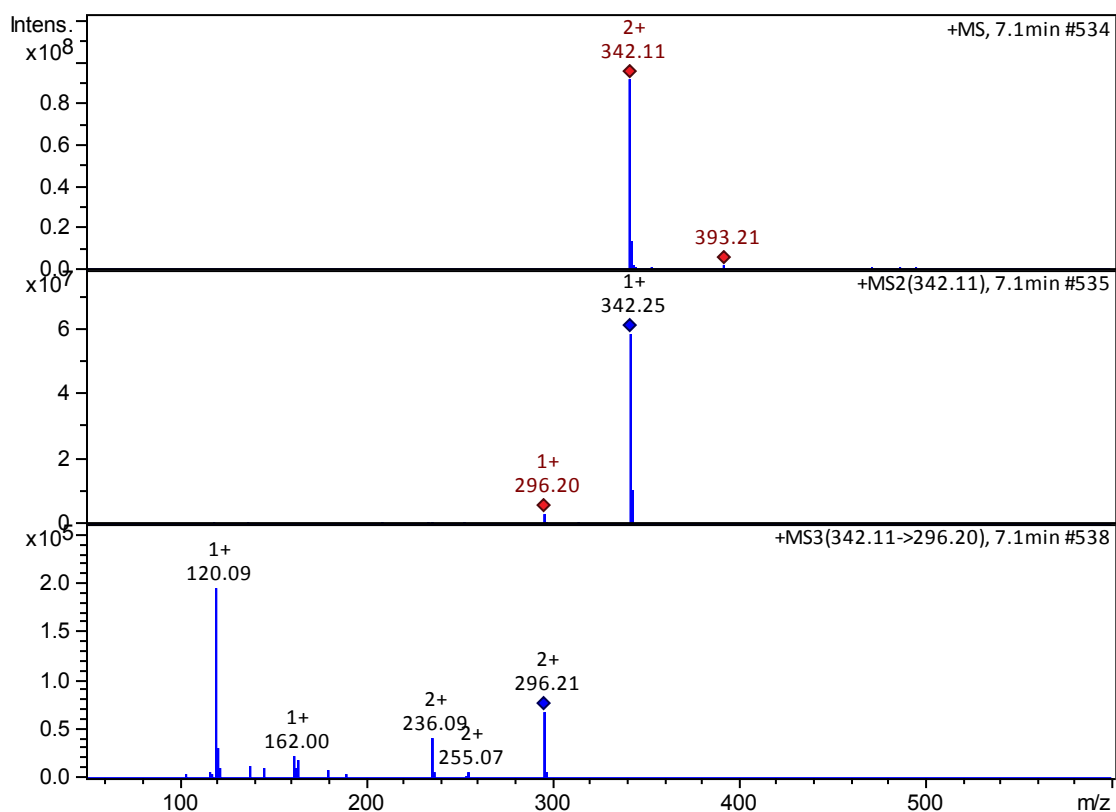
**Figura 25.** Cromatogramas do íon de  $m/z$  342 selecionado a partir do TIC dos extratos hidroalcoólicos de folhas e sementes de *C. spectabilis*.



Ao analisar os cromatogramas do íon extraído  $m/z$  342, apresentado na Figura 25, podemos observar a maior intensidade, deste alcaloide pirrolizidinico *N*-óxido no extrato de folhas de *Crotalaria spectabilis* se comparada aos extratos hidroalcoólicos de semente dessa espécie.

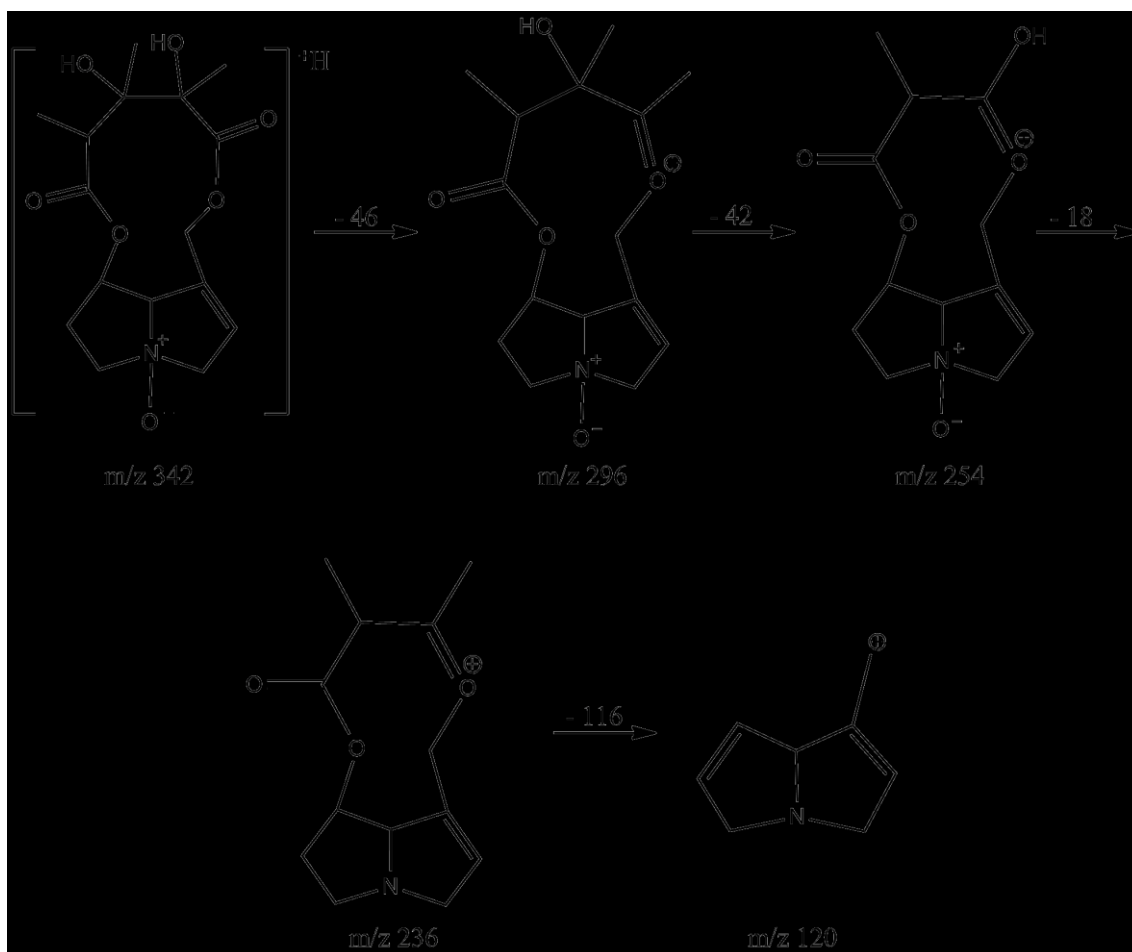
Na Figura 26, apresentamos o espectro de massas para o íon de  $m/z$  342 e suas fragmentações em MS2 e MS3, característico da monocrotalina *N*-óxido, esse espectro é proveniente do extrato EtOH 80% (v/v) de folhas de *C. spectabilis*, e o mesmo padrão de fragmentação apresentado corresponde ao do extrato EtOH 80% (v/v) de sementes. Entre os fragmentos obtidos experimentalmente a partir do íon precursor de  $m/z$  342,13 estão os íons com  $m/z$ : 296,16; 253,15; 236,03; 162,04 e 120,11.

**Figura 26.** Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM para o íon de  $m/z$  342 referente ao extrato etanólico de folhas de *C. spectabilis*.



A proposta para fragmentação do íon precursor de  $m/z$  342,11 partindo da estrutura do metabólito monocrotalina *N*-óxido, se dá através do mecanismo proposto por Avula, B. et al (2015), sendo esse um mecanismo geral para alcaloides pirrolizidínicos e alcaloides pirrolizidínicos *N*-óxido, apresentado na Figura 27.

**Figura 27.** Proposta de fragmentação do íon de  $m/z$  342,12 a partir da estrutura do metabólito monocrotalina *N*-óxido.



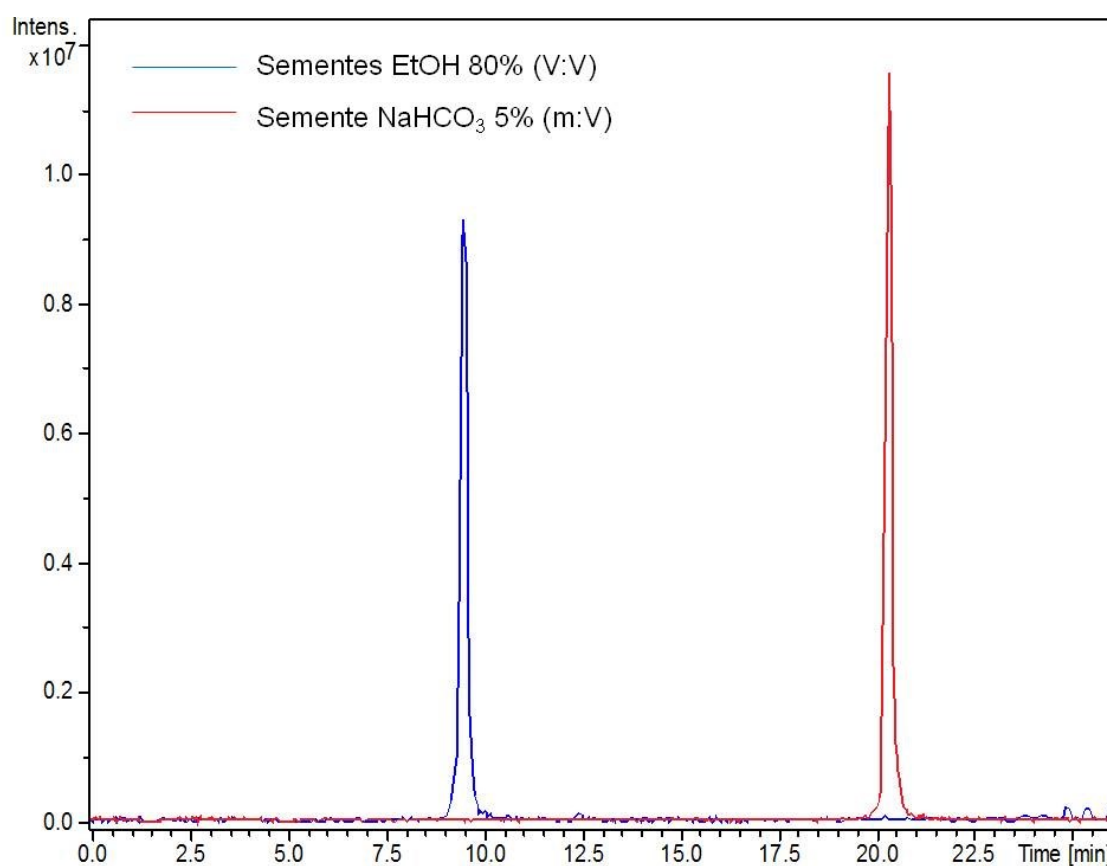
#### 4.3.3 Senecionina *N*-óxido

Senecionina *N*-óxido é um alcaloide pirrolizidínico proveniente da senecionina, Zhang e seus colaboradores (2017), identificaram esse composto por UPLC-Q-Orbitrap/MS na espécie *Crotalaria sessiliflora*. Segundo levantamento feito por Avula (2015), a senecionina e a senecionina *N*-óxido são encontrados principalmente em plantas da família Asteraceae, no gênero *Senecio* e na família Fabaceae. Zhou e colaboradores (2012) relataram que a senecionina apresentou efeitos nematicidas e repelentes para diversas espécies de nematoides como, *Meloidogyne incognita*, *Heterodera schachtii*, entre outros (ZHOU et al., 2012).

A Figura 28 apresentamos o cromatograma TIC para o íon de  $m/z$  352 selecionado nas análises por CLAE-EM/EM dos extratos de sementes de *C.*

*spectabilis* hidroalcoólico e alcalino. Os picos não estão sobrepostos pois os métodos de separação cromatográfica foram diferentes.

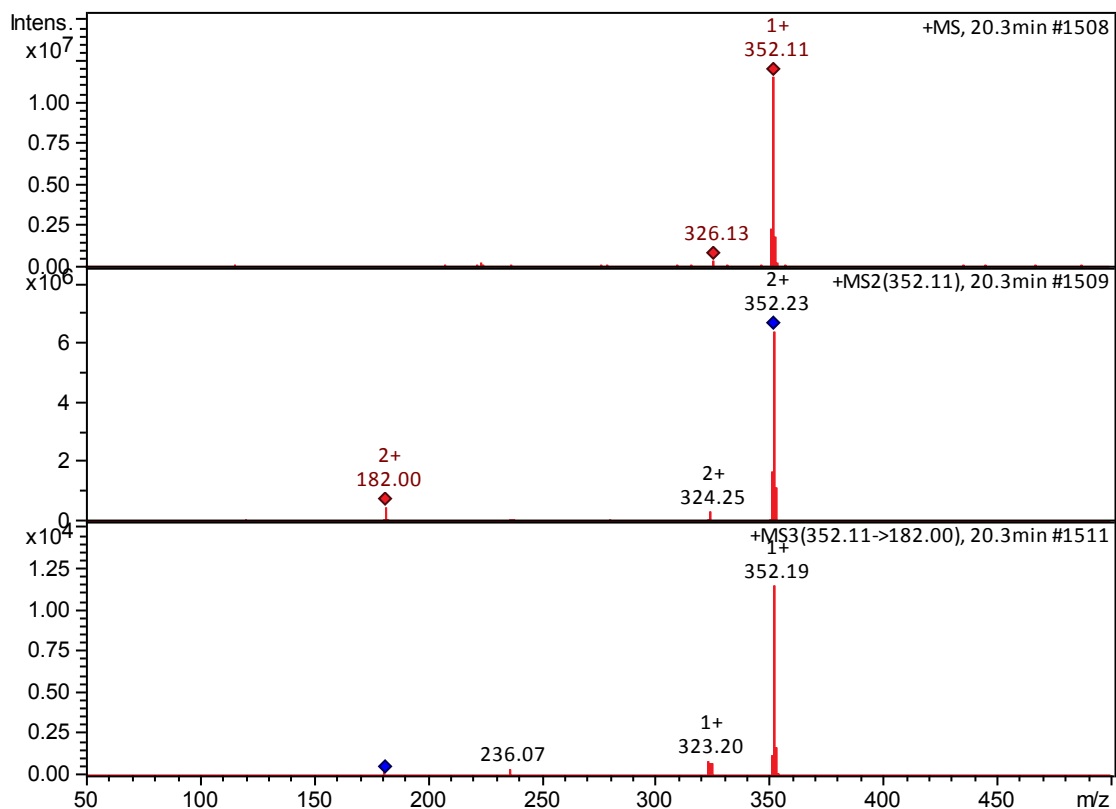
**Figura 28.** Cromatogramas do íon  $m/z$  352 selecionado a partir dos cromatogramas de íon total (TIC) presente nos dois extratos de sementes de *Crotalaria spectabilis*.



Ao analisar os cromatogramas do íon extraído  $m/z$  352, apresentado na Figura 28, podemos observar o alto teor da senecionina *N*-óxido nos extratos de sementes de *Crotalaria spectabilis*.

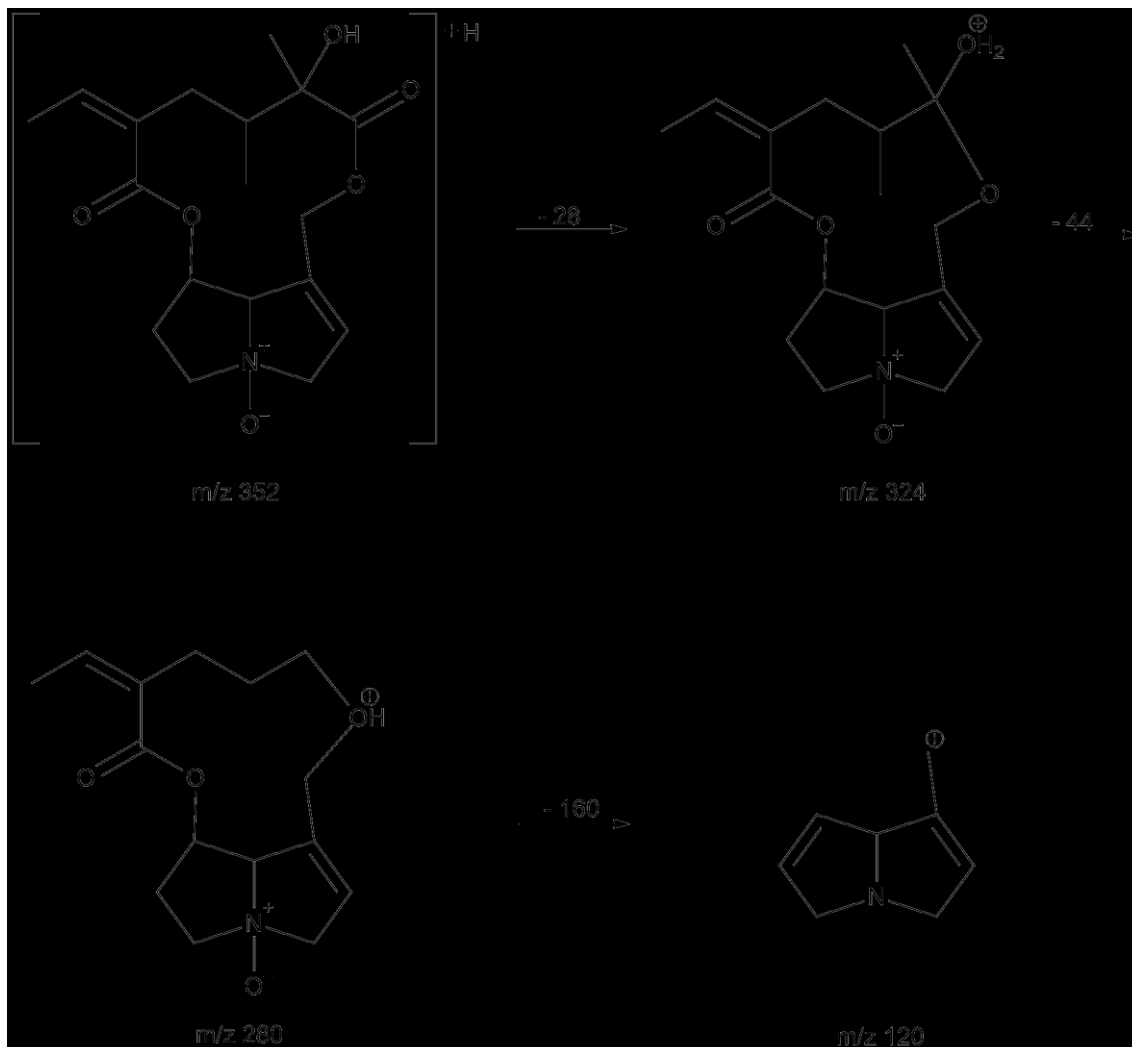
A presença da senecionina *N*-óxido nos extratos de sementes, pode ser confirmada através da avaliação dos padrões de fragmentações obtidos experimentalmente (Figura 29), que contém os fragmentos em MS, MS2 e MS3 iguais a  $m/z$  de: 352,11; 324,25; 323,20; 236,07 e 182,00, essas fragmentações obtidas experimentalmente foram comparadas com padrões de fragmentações propostos na literatura.

**Figura 29.** Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM para o íon precursor de  $m/z$  352,11 proveniente da análise do extrato alcalino de sementes de *C. spectabilis*.



A Figura 30 apresenta a proposta do padrão de fragmentação para o íon de  $m/z$  352,11 a partir da estrutura da senecionina *N*-óxido, de acordo com o padrão sugerido por Ruan e colaboradores (2012).

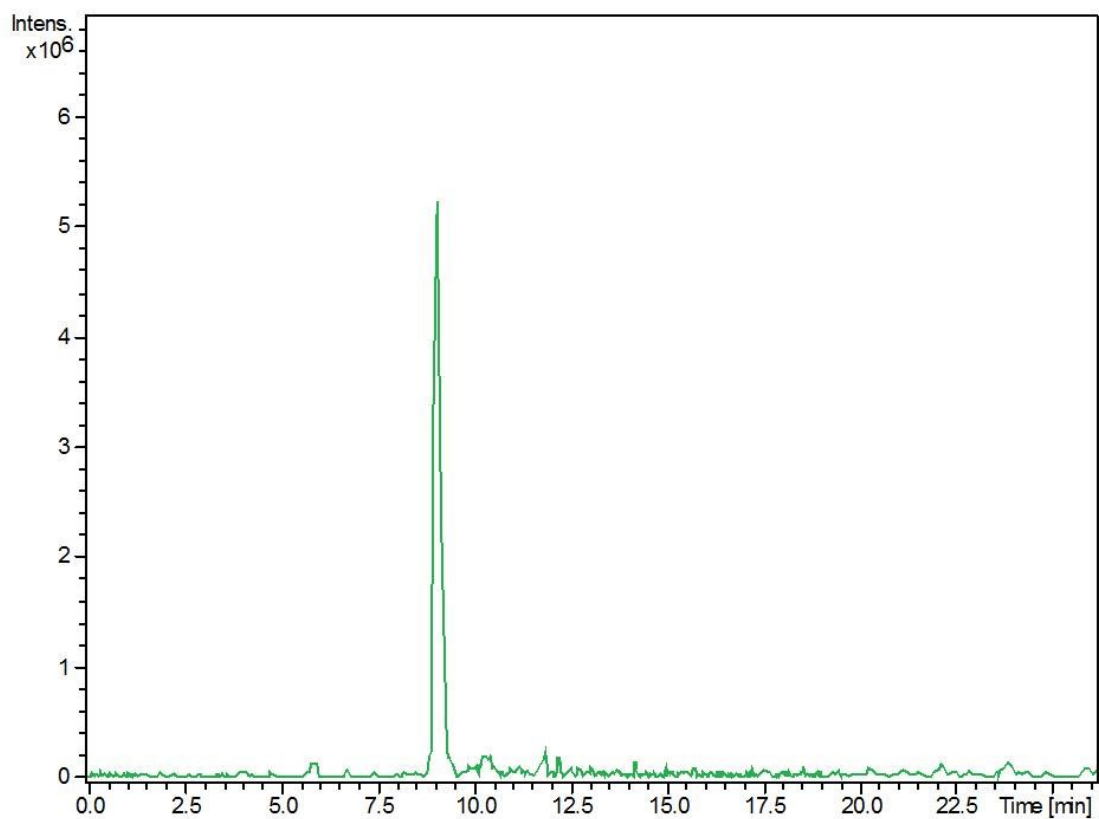
**Figura 30.** Proposta de fragmentação do íon  $m/z$  352,12 a partir da estrutura do metabólito senecionina *N*-óxido.



#### 4.3.4 Rutina

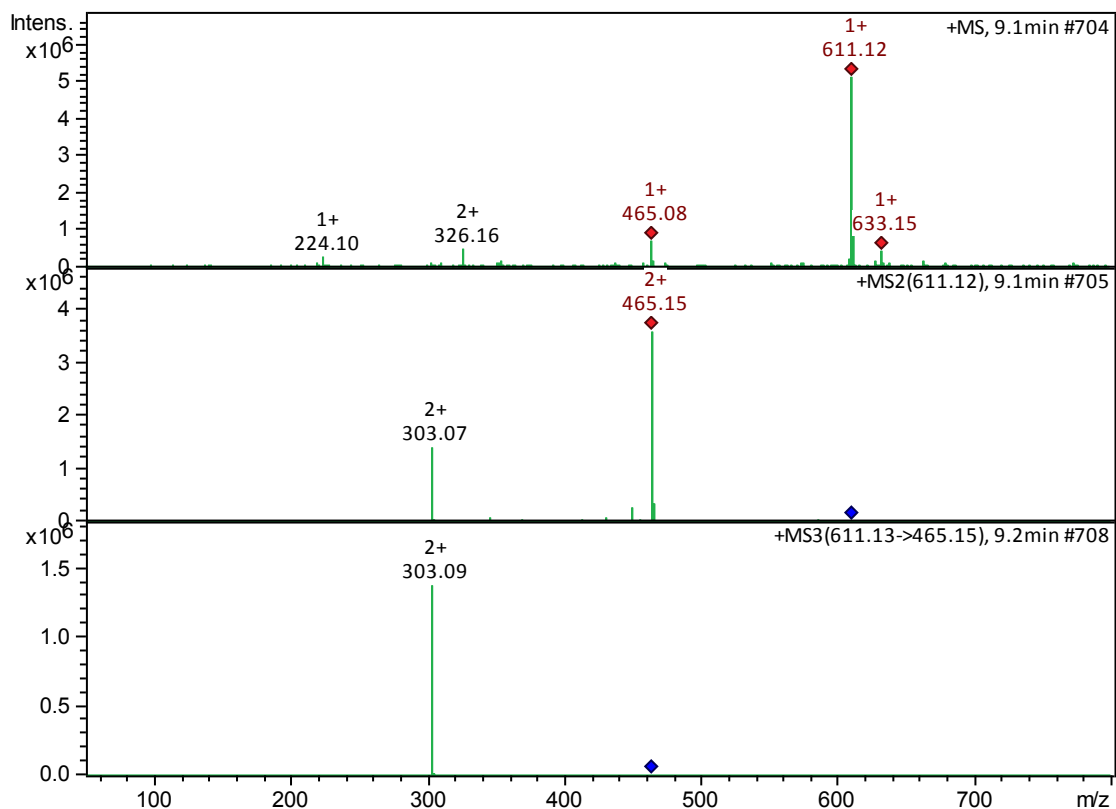
A Rutina é um flavonoide conhecido por apresentar diversas atividades biológicas, como antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, anticancerígena entre outras. Quando a planta é submetida a fatores endógenos (hormônios) ou exógenos (estresse hídrico, temperatura) limitantes ou excessivos, o teor de rutina aumenta e essa atua na proteção da planta. (GUPTA; CHAUHAN; PRADHAN, 2014). A Figura 31 se refere ao cromatograma do íon extraído de  $m/z$  611,12 selecionado do experimento realizado com extrato EtOH 80% de sementes de *Crotalaria spectabilis*.

**Figura 31.** Cromatograma do íon de  $m/z$  611,12 selecionado a partir do TIC do extrato EtOH de sementes de *C. spectabilis*.

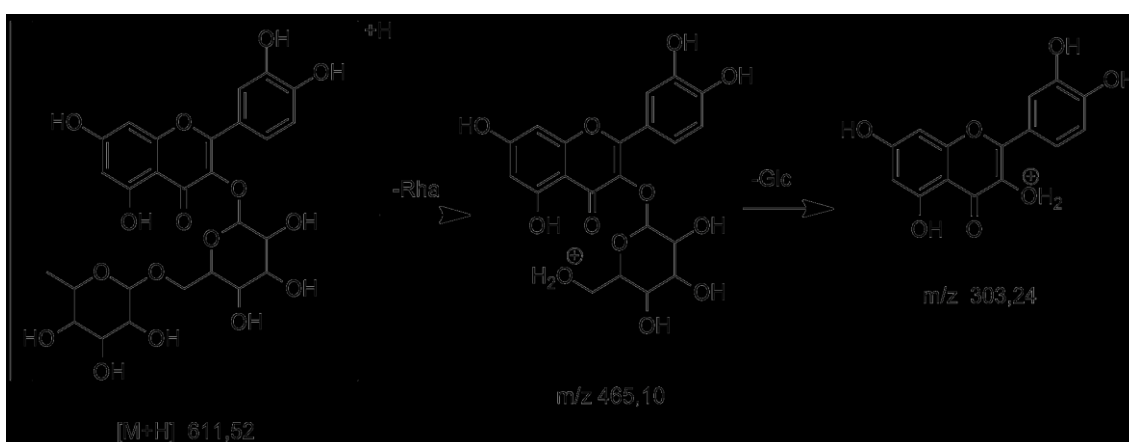


O espectro de massas que consta na Figura 32, foi gerado a partir do íon precursor de  $m/z$  611,12 em MS, e os fragmentos em MS2 e MS3 foram de  $m/z$  465,15 e 303,09, respectivamente. A fim de confirmar a presença da substância rutina no extrato, foi proposto um padrão de fragmentação mostrado na Figura 33, com esse padrão de fragmentação de flavonoide baseado na literatura, foi possível identificar e confirmar a presença desta molécula no extrato EtOH 80% (v/v) de sementes de *C. spectabilis*.

**Figura 32.** Espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM para o íon de  $m/z$  611,12 e suas fragmentações em MS2 e MS3 a partir do extrato EtOH 80% de sementes de *C. spectabilis*.



**Figura 33.** Proposta de fragmentação para o íon de  $m/z$  611,12 a partir da estrutura da rutina.



#### 4.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE E A COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS DE *CROTALARIA SPECTABILIS*

Os extratos NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) de folhas e sementes de *C. spectabilis* na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>, foram os extratos que apresentaram maior ação nematostática contra o nematoide *Heterodera glycines*, com taxas de mortalidade acima de 90% dos indivíduos testados, sendo 94,95 ± 5,11% para o extrato de folhas e 95,95 ± 4,39% para o extrato de sementes. Para a espécie de nematoide *M. javanica*, o extrato de folhas NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) apresentou taxa de mortalidade de 89,52 ± 6,73%, mostrando que seus indivíduos foram susceptíveis ao extrato (Tabela 12).

O extrato EtOH 80% (v/v) de sementes de *C. spectabilis* exposto ao nematoide *H. glycines* e o extrato de sementes NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) em contato com o *M. javanica* apresentaram 43,78 ± 1,99% e 43,57 ± 11,70% de mortalidade, respectivamente (Tabela 12).

O extrato EtOH 80% (v/v) de folhas não apresentou atividade considerável para os nematoides da soja testados, apresentando taxas de mortalidade abaixo de 13%. O extrato EtOH 80% (v/v) de sementes de *C. spectabilis* resultou em uma mortalidade menor que 12% para o nematoide *M. javanica*. Esses resultados, associados a presença ou ausência dos metabólitos monocrotalina (1), monocrotalina N-óxido (2), senecionina N-óxido(3) e rutina(4) são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Presença ou ausência de monocrotalina (1), monocrotalina N-óxido (2), senecionina N-óxido (3) e rutina (4) nos extratos de *C. spectabilis* associados com as taxas de mortalidade dos nematoides.

Extrato	Parte da planta	Mortalidade de <i>H. glycines</i> (%)	Mortalidade de <i>M. javanica</i> (%)	Presença dos compostos			
				1	2	3	4
NaHCO <sub>3</sub>	Semente	95,95±4,39	43,57±11,70	Sim	Não	Sim	Não
	Folha	94,95±5,11	89,52±6,73	Não	Não	Não	Não
EtOH 80%	Semente	43,78±1,99	12,15±2,1	Sim	Sim	Sim	Sim
	Folha	1,85±2,62	13,84±5,11	Sim	Sim	Não	Não

Thoden e colaboradores (2009) estudaram o efeito de supressão do nematoide de galha *Meloidogyne incognita* e *Heterodera schachtii* em soluções com os padrões monocrotalina, monocrotalina *N*-óxido e senecionina *N*-óxido nas concentrações de 10,0; 1,0; 0,1 e 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, nos tempos de exposição de 20, 96 e 168 h. Dessa forma foi avaliado seu efeito nematostático. Após esses períodos, os nematoides foram lavados e recuperados em água destilada, permaneceram durante 24 h, para posterior avaliação do efeito nematicida.

No tempo de 20 h, houve somente o efeito de inibição do nematoide *M. incognita* pela monocrotalina de *H. schachtii* pelo composto senecionina *N*-óxido, enquanto que no tempo de 168h com o nematoide *H. schachtii* os metabólitos monocrotalina, monocrotalina *N*-óxido e senecionina *N*-óxido induziram o efeito nematostático, já para o nematoide *M. incognita*, somente a monocrotalina e a senecionina *N*-óxido induziram esse efeito. O efeito de mortalidade de nematoides (nematicida) descrita para monocrotalina, foram constatados para as duas espécies de nematoides estudada por Thoden e colaboradores (2009), já a monocrotalina *N*-óxido demonstrou o efeito nematicida quando testada em *H. schachtii*, enquanto a senecionina *N*-óxido não demonstrou esse efeito de mortalidade para ambos os nematoides nas concentrações estudadas (THODEN; BOPPRÉ; HALLMANN, 2009).

Thoden e colaboradores (2009) também relatam que o efeito tóxico de alcaloides pirrolizidínicos depende da concentração, do estado de oxidação da molécula, da espécie de nematoide e se nesse há presença do citocromo P450.

Em nosso estudo, o extrato alcalino de folhas de *C. spectabilis*, foi o extrato que apresentou a maior atividade nematicida, assim foram realizados os estudos de identificação das substâncias presentes nesse extrato, entretanto, pode-se notar que houve pouca ionização das substância no cromatograma de íon total (Figura 21 (b)) para esse extrato, analisado por CLAE-EM/EM.

O metabólito monocrotalina foi identificado em três dos extratos de *C. spectabilis* estudados nesse trabalho (Tabela 12), desses extratos somente o alcalino de sementes apresentou porcentagem de mortalidade elevada,

95,95±4,39% para o nematoide *H. glycines* e uma atividade tóxica moderada de aproximadamente 43% de mortalidade para o nematoide *M. javanica*. Uma atividade tóxica moderada também foi obtida pelo extrato hidroalcoólico de sementes para o nematoide *H. glycines* (43,78 ± 1,99% de mortalidade do nematoide). Para os extratos de folhas com EtOH 80% para os dois nematoides testados mostraram porcentagem de mortalidade abaixo de 13%. Assim, no caso da monocrotalina, não pode ser confirmada sua influência na mortalidade dos nematoides, levando em consideração que no extrato NaHCO<sub>3</sub> de folhas ocorreu alta susceptibilidade dos nematoides da soja, e não foi encontrada a presença de monocrotalina.

A monocrotalina *N*-óxido, somente foi identificada em extratos que obtiveram porcentagem de mortalidade de nematoide inferior a 43%, sendo eles os extratos de sementes e folhas com EtOH 80%, associada com a presença de monocrotalina, sabe-se que os *N*-óxidos podem ter determinado grau de toxicidade, porém menor que seu alcaloide pirrolizidinico correspondente, fato corroborado pelo estudo já citado de Thoden e colaboradores (2009), em que a concentração necessária para mortalidade de 50% dos nematoides testados foi de 1,7 mg mL<sup>-1</sup> para monocrotalina e 37,1 mg mL<sup>-1</sup> para seu *N*-óxido.

A senecionina *N*-óxido, está presente nos dois extratos de sementes, alcalino e EtOH 80%, nos quais também foi confirmada a presença da monocrotalina. De acordo com Thoden e colaboradores (2009), a senecionina *N*-óxido não apresenta efeito nematostático, supõe-se então que o efeito nematostático poderia ser atribuído à monocrotalina.

A rutina, foi encontrada no extrato EtOH de sementes de *C. spectabilis*, nesse extrato a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 43%. Wuyts e colaboradores (2006) estudaram o efeito de diversas substâncias sobre *M. incognita*, segundo os autores a rutina apresentou efeitos inibitórios, porém, não letais, para o nematoide testado (WUYTS; SWENNEN; DE WAELE, 2006).

## 5 CONCLUSÕES

Conclui-se que nos ensaios de susceptibilidade de nematoides da soja aos extratos de *Crotalaria spectabilis*, na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>,

somente o solvente extrator apresentou significância na avaliação do efeito nematostático.

Em relação à avaliação do efeito nematicida, conclui-se que somente o solvente extrator e a espécie de nematoide foram fatores significativos nas respostas de porcentagem de mortalidade dos nematoides *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. Os extratos NaHCO<sub>3</sub> 5% (m/v) de folhas ou sementes para o nematoide *H. glycines*, com taxa de mortalidade de 94,95± 5,11% para o extrato de folhas e 95,95± 4,39% para o extrato de sementes, apresentaram a melhor atividade nematicida

Ao analisar os extratos alcalinos de folhas e sementes por CLAE-EM/EM, priorizou-se a busca por compostos alvos já relatados, pela literatura da área, em diferentes espécies do gênero *Crotalaria*, a fim de realizar a desreplicação dos espectros de massas e a identificação das substâncias sem a necessidade de isolamento experimental prévio. Assim, foram identificadas 4 substâncias: a monocrotalina ( $m/z$  326,15), a monocrotalina *N*-óxido ( $m/z$  342,11), a senecionina *N*-óxido ( $m/z$  352,11) e a rutina ( $m/z$  611,12), e seus padrões de fragmentação confirmados.

Inúmeros fatores podem influenciar na mortalidade de nematoides que atacam as culturas de soja, e acredita-se que algumas espécies podem conter o citocromo P450, que oxida a monocrotalina, formando seu metabólito mais tóxico (dehidromonocrotalina), promovendo assim a mortalidade desses indivíduos. A monocrotalina *N*-óxido, pode apresentar uma atividade tóxica, porém menor que a monocrotalina. A senecionina *N*-óxido e a rutina, foram relatadas com potencial de inibição de nematoides (efeito nematostático) de acordo com a literatura, porém, não apresentaram atividade nematicida. Dessa forma, analisando os resultados obtidos nos experimentos desenvolvidos para esse trabalho, pode-se atribuir o efeito nematicida em parte à monocrotalina e as demais substâncias presentes que serão identificadas em futuros estudos.

Com este trabalho relatou-se pela primeira vez o estudo da composição química da espécie *C. spectabilis* com a identificação de 4 substâncias nos extratos, com o desenvolvimento do planejamento fatorial experimental na otimização dos ensaios e todos ensaios com os nematoides vivos. Atribuímos os efeitos nematostático e nematicida dos extratos a algumas

moléculas, de suma importância para o desenvolvimento de um bioproduto para a agricultura de soja e outros alimentos atacados pelos nematoides.

## REFERÊNCIAS

ABAD, P.; WILLIAMSON, V. M. **Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 53

AVULA, B. et al. Corrigendum to Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 178, p. 136–148, 2015.

AWOOUAFACK, M. D. et al. Antimicrobial isopropenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 2, p. 272–278, 2011.

AYDIN, A. A.; LETZEL, T. Simultaneous investigation of sesquiterpenes, pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in Butterbur (*Petasites hybridus*) with an offline 2D-combination of HPLC-UV and LC-MMI-ToF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 74–82, 2013.

BONETTI, J. I. S. e FERAZ, S. Modificações do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, n. 3, p. 553, 1981.

CABONI, P. et al. Nematicidal activity of (E, E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1146–1151, 2012.

CAO, J. et al. Development of abamectin loaded plant virus nanoparticles for efficacious plant parasitic nematode control. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 18, p. 9546–9553, 2015.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Protein profile of mature soybean seeds and prepared soybean milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9893–9899, 2014.

CARVAJAL, A. E. S. S. et al. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A.blazei) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 493–499, 2012.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégia e validação**, São Carlos, EdUFSCar, 2013.

CHITWOOD, D. J. PHYTOCHEMICAL BASED STRATEGIES FOR NEMATODE CONTROL. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 221–249, 2002.

COLEGATE, S. M. et al. Dehydropyrrolizidine alkaloids, including monoesters with an unusual esterifying acid, from cultivated *Crotalaria juncea* (Sunn Hemp cv.'Tropic Sun'). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3541–3550, 2012.

- CONAB, 2016. Boletim de acompanhamento da safra brasileira de grãos. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_07\\_10\\_39\\_11\\_bol\\_etim\\_graos\\_abril\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_07_10_39_11_bol_etim_graos_abril_2016.pdf), acessada em Fevereiro 2017.
- DE OLIVEIRA, W. R. et al. Isolation, characterization and analysis of the agglutinative activity of a lectin from *Crotalaria spectabilis*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 3456789, 2018.
- DEEPPHA, V. et al. Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globosa*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, p. 737–745, 2014.
- DIAS, W. P. et al. Nematóides em Soja: Identificação e Controle 76. p. 1–8, 2010.
- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; KIIHL, R. A. S.; HIROMOTO, D. M.; ABDELNOOR, R. V. Quebra de resistência da cv. Hartwig por populações de campo de nematóides de cisto da soja (*Heterodera glycines*). **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n. 36, p. 971 – 974, 1998.
- FLETCHER, M. T. et al. Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria taxa* from Northern Australia: Risk to grazing livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 311–319, 2009.
- FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. A synopsis of the genus *crotalaria* (Leguminosae) in Brazil. **Phytotaxa**, v. 346, n. 1, p. 31–58, 2018.
- FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. G. DE A.; TRIGO, J. R. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 459–469, 2009.
- GORROCHATEGUI, E. et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425–442, 2016.
- GUPTA, N.; CHAUHAN, R. S.; PRADHAN, J. K. 5. Rutin: A bioactive flavonoid. v. 661, n. 2, p. 51–57, 2014.
- HU, X. R.; CHOU, G. X.; ZHANG, C. G. Flavonoids, alkaloids from the seeds of *Crotalaria pallida* and their cytotoxicity and anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 143, p. 64–71, 2017.
- IRMER, S. et al. New aspect of plant–rhizobia interaction: Alkaloid biosynthesis in *Crotalaria* depends on nodulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 4164–4169, 2015.
- JAIN, S. et al. Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible common bean genotypes in response to soybean cyst nematode infection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–13, 2016.

KEARN, J. et al. Fluensulfone is a nematicide with a mode of action distinct from anticholinesterases and macrocyclic lactones. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 109, n. 1, p. 44–57, 2014.

KIM, K. S. et al. Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 12, p. 2295–2311, 2016.

KIM, M. Y. et al. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7265–7270, 2008.

LI, Y. et al. Different responses of soybean cyst nematode resistance between two RIL populations derived from Peking × 7605 under two ecological sites. **Journal of Genetics**, v. 95, n. 4, p. 975–982, 2016.

MARTINEZ, S. T. et al. Chemistry of pyrrolizidine alkaloids revisited - Semi-synthetic microwave and continuous-flow approaches toward Crotalaria-alkaloids. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 30, p. 4181–4184, 2014.

MARTINS, C. H. Z. et al. Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.

MIAMOTO, A. et al. Penetration and Reproduction of *Meloidogyne javanica* on Leguminous Crops. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 11–12, p. 890–895, 2016.

MIYARA, S. B. et al. **The role of lipid signalling in regulating plant-nematode interactions**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. v. 73

MODESTO-COSTA, L. et al. Elucidating the mass spectrum of the retonecine alkaloid using DFT calculations. **Journal Mass Spectrometry**, doi: 10.1002/jms.4253, 2018.

NAZ, I. et al. Cis- and trans-protopinium, a novel nematicide, for the eco-friendly management of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v. 81, p. 138–144, 2016.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, Campinas, SP, Editora da Unicamp, 2001.

NEUNER-JEHLE, N.; NESVADBA, H.; SPITELLER, G. Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt.: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. **Monatshefte für Chemie**, v. 96, 1965.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments-A review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101–115, 2010.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50–54, 2014.

PITANGA, B. P. S. et al. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 6, p. 776–784, 2011.

RIOS, C.M.D. Quantificação da patogenicidade de *Meloidogyne incognita*. **Dissertação de mestrado**, Escola Superior de Agricultura de Lavras, M.G., 1990, 75p.

ROCHA, R. O. et al. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5335–5343, 2015.

ROCHA, T. L. et al. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 87–100, 2017.

RÖSEMANN, G. M.; BOTHA, C. J.; ELOFF, J. N. Distinguishing between toxic and non-toxic pyrrolizidine alkaloids and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. **Phytochemistry Letters**, v. 8, n. 1, p. 126–131, 2014.

RUAN, J. et al. Characteristic ion clusters as determinants for the identification of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in pyrrolizidine alkaloid-containing natural products using HPLC-MS analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 3, p. 331–337, 2012.

SAKAMOTO, S. et al. Ultrasensitive immunoassay for monocrotaline using monoclonal antibody produced by N, N'-carbonyldiimidazole mediated hapten-carrier protein conjugates. **Talanta**, v. 168, n. January, p. 67–72, 2017.

SEESAO, Y. et al. A review of methods for nematode identification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 37–49, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al, **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis, Editora Da UFSC, 2010.

SONG, D. et al. Large-scale patterns of distribution and diversity of terrestrial nematodes. **Applied Soil Ecology**, v. 114, n. 2016, p. 161–169, 2017.

SUN, Q. H. et al. Two new pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria albida*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 449–452, 2013.

- TANG, X. et al. Simultaneous extraction and separation of flavonoids and alkaloids from *Crotalaria sessiliflora* L. by microwave-assisted cloud-point extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 175, p. 266–273, 2017.
- THODEN, T. C.; BOPRÉ, M. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, v. 12, p. 24, 2010.
- THODEN, T. C.; BOPRÉ, M.; HALLMANN, J. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. **Pest Management Science**, v. 65, n. 7, p. 823–830, 2009.
- TOHGE, T.; FERNIE, A. R. Web-based resources for mass-spectrometry-based metabolomics: A user's guide. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 450–456, 2009.
- USDA, 2018. World Agricultural Production. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>, acessada em Fevereiro 2018.
- WUYTS, N.; SWENNEN, R.; DE WAELE, D. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 8, n. 1, p. 89–101, 2006.
- YANG, X. et al. Comparative Study of Hepatotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids Retrorsine and Monocrotaline. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 532–539, 2017.
- YANG, Y. C. et al. <sup>1</sup>H NMR study of monocrotaline and its metabolites in human blood. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2793–2799, 2011.
- ZHANG, W. et al. Ultra-Performance Liquid Chromatography Hyphenated with Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Necine-Core-Structure Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all Corresponding Standards. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 365–373, 2017.
- ZHOU, L. et al. **Secondary metabolites with antinematodal activity from higher plants**. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 37