

Preparação e caracterização química de extratos brutos de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca*

Jeniffer Gomes Feitosa¹, Larissa Andreani², José Antonio de Aquino Ribeiro³, Clenilson Martins Rodrigues⁴

Resumo

Entre as vertentes que promovem a bioeconomia, estão o estudo e o desenvolvimento de bioinsumos com a capacidade de substituir produtos petroquímicos prejudiciais à saúde e ao ambiente. A utilização de produtos naturais ricos em metabólitos secundários como agentes de controle de pragas é um dos exemplos da aplicação dos bioinsumos. Destaca-se que algumas espécies da família Fabaceae são utilizadas como adubo verde e apresentam uma vasta quantidade de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e biocidas interessantes. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos a preparação de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca* a partir de diferentes frações do material moído e a avaliação do seu perfil químico. Os extratos foram obtidos, em sua maioria, em rendimentos superiores a 15% e houve diferença estatística significativa quando a biomassa foi tamisada e segregada antes da preparação dos extratos. Nos extratos produzidos, foi verificada a presença de aminoácidos, nucleotídeos, flavonoides, alcaloides e derivados de ácido hidroxicinâmico, indicando que as espécies estudadas possuem potencial para utilização como ingredientes de formulações biocidas.

Termos para indexação: *Crotalaria* spp., metabólitos secundários, bioinsumo.

Introdução

Os metabólitos secundários são compostos químicos produzidos por organismos vivos, como plantas, animais, fungos e microrganismos, e que não estão diretamente envolvidos em seu crescimento e desenvolvimento. Estima-se que mais de 100.000 deles sejam produzidos por plantas, e muitos desses compostos têm sido alvo de grande interesse para a medicina, indústria alimentícia, agricultura e outras áreas de pesquisa, principalmente por a suas características benéficas (Pérez-Alonso et al., 2011). Na agricultura, os metabólitos secundários podem ser explorados no desenvolvimento de pesticidas naturais a partir da seleção de plantas que apresentam maiores teores de metabólitos secundários com atividade biológica.

Diversas espécies de leguminosas, pertencentes à família Fabaceae, são consideradas plantas antagonistas e utilizadas como bioinsumos: nematicida natural e adubo verde. O gênero *Crotalaria* é considerado um dos maiores desta família, contando com 690 espécies espalhadas por regiões de clima tropical ou semitropical. No continente americano, são conhecidas 74 espécies, 59 endêmicas e 35 de ocorrência na América do Sul (Mauad et al., 2019). A atividade antagônica de espécies como *Crotalaria juncea* foi comprovada no controle de fitonematoides, podendo assim favorecer grandes plantações que se encontram comprometidas em razão dos elevados níveis populacionais desses fitoparasitas (Schwan, 2003).

¹ Graduanda em Química, Universidade de Brasília, jeniffer.feitosa@colaborador.embrapa.br

² Química, doutora em Físico-Química, Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento de extração e composição química de extratos preparados a partir de *C. juncea* e *C. ochroleuca*, correlacionando com modelos distintos de extração e com o tamanho da biomassa empregada nos processos extrativos. Dessa forma, as informações desses resultados podem favorecer a sua futura utilização em formulações nematicidas e/ou no desenvolvimento de novos produtos agroecológicos.

Materiais e métodos

Sementes de *C. juncea* e *C. ochroleuca* (Sementes Piraí Ltda.) foram secas até massa constante, moídas e tamisadas em agitador de peneiras vibratório. As partículas foram separadas nas seguintes faixas de tamanhos: integral (material triturado não tamisado), >850 μm , 849 μm –425 μm , 424 μm –300 μm , 299 μm –250 μm e <250 μm . Em sequência, as amostras passaram por processos de extração padronizados (proporção biomassa/solvente mantidos), sendo empregadas quatro condições distintas (refluxo aquoso, refluxo aquoso acidificado, percolação hidroalcoólica e agitação hidroalcoólica), as quais não serão detalhadas por questões de sigilo. Após as extrações, as soluções resultantes foram rotaevaporadas (no caso de extrações hidroalcoólicas), congeladas e liofilizadas. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. O rendimento dos processos de extração foi calculado considerando a massa inicial de sementes moídas usadas e a massa do extrato bruto obtido. A análise estatística foi realizada a partir da média \pm desvio padrão dos dados de rendimento dos processos extrativos/tratamentos, efetuando-se análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Em todas as análises, foi selecionada a probabilidade de erro inferior a 0,05% (critério para a significância).

Análises cromatográficas - A Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) foi empregada na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos obtidos. Os compostos separados foram avaliados e monitorados com o detector de arranjo de fotodiodos (PAD) com varredura na faixa espectral de 200 nm a 400 nm. Alíquotas de 1 μL das amostras foram injetadas nas seguintes condições: coluna de fase reversa *Acquity UPLC HSST3* 1,8 μm , 2,1 mm x 150 mm; vazão: 0,400 mL/min; temperatura da coluna: 40 °C; modo de eluição: gradiente composto pelas fases móveis: a) $\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA; b) Acetonitrila/ $0,1\%$ TFA; curva gradiente: 5%–55% B (0,0 min–15,0 min, linear), 55%–100% B (15,0 min–18,0 min, linear), 100% B (18,0 min–20,0 min, isocrático), 5% B (20,0 min–25,0 min, reequilíbrio, isocrático).

Resultados e discussão

Para *C. juncea*, a Figura 1 apresenta os valores médios dos rendimentos obtidos para cada tipo de processo de extração e a análise de variância, aplicada intratamentos, indica que há diferença estatística notável apenas no grupo de tratamentos do processo de extração por refluxo aquoso. Nessa condição, a extração que empregou partículas das sementes de *C. juncea* com tamanho < 250 μm forneceu o maior rendimento ($40,85 \pm 2,12\%$) dentro do conjunto de tratamentos. No processo de extração por agitação, é provável que o elevado coeficiente de variação obtido para o tratamento com as sementes de *C. juncea* com tamanho integral tenha impedido a diferenciação estatística, o que será revisado futuramente.

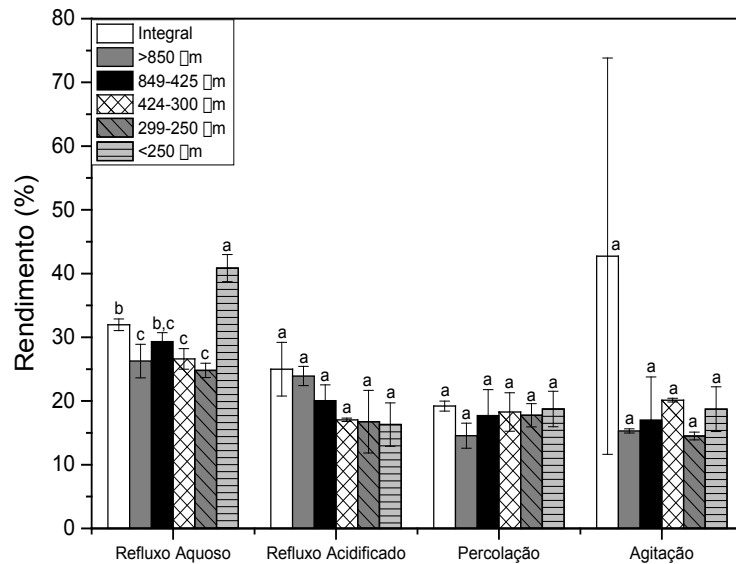


Figura 1. Rendimentos de extratos brutos de *C. juncea*. Letras distintas indicam diferença estatística.

De forma análoga, para *C. ochroleuca* os resultados estatísticos, ilustrados na Figura 2, evidenciam que dois modelos de extração se destacaram e apresentaram resultados que diferem estatisticamente dos demais. No processo de extração por refluxo aquoso, os tratamentos que empregaram as sementes de *C. ochroleuca* com tamanhos de partículas de 299 µm–250 µm e < 250 µm foram os que apresentaram os maiores valores de rendimento ($37,37 \pm 3,23\%$ e $39,00 \pm 2,49\%$, respectivamente) e eles diferem estatisticamente dos demais intratratamentos. No caso do processo de extração por refluxo aquoso acidificado, fica evidente a seletividade de extração dos metabólitos para as sementes de *C. ochroleuca* com tamanho de partícula > 850 µm, tratamento que fornece o maior valor de extrativos recuperados ($40,03 \pm 3,36\%$), sendo que este resultado difere estatisticamente dos demais intratratamentos (Figura 2).

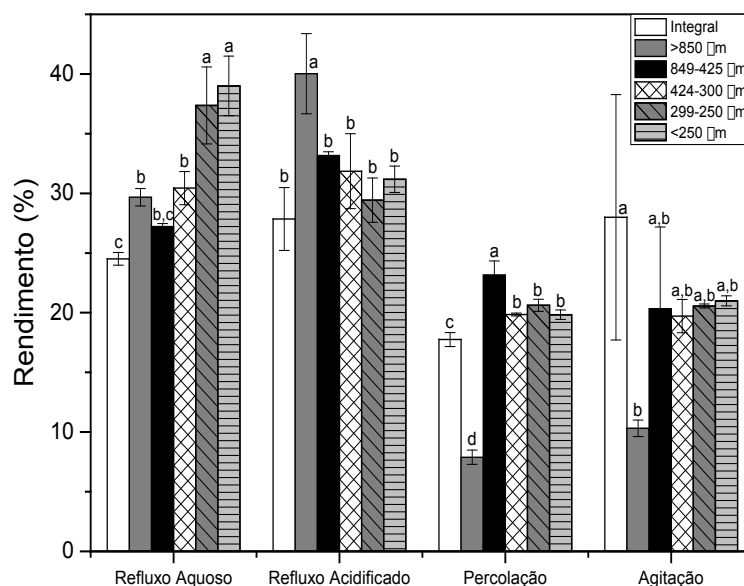


Figura 2. Rendimentos de extratos brutos de *C. ochroleuca*. Letras distintas indicam diferença estatística.

Embora haja intratratamentos para os processos de extração por percolação e por agitação que se diferenciam estatisticamente, os valores de extrativos recuperados são menos eficazes

($7,89 \pm 0,59\%$ a $28,00 \pm 10,29\%$) que aqueles observados para os processos envolvendo refluxo aquoso e refluxo aquoso acidificado. Muito provavelmente serão processos preteridos em fases de escalonamento, tendo em vista que recuperam menor quantidade dos metabólitos de interesse. Para ilustrar a composição química, os perfis cromatográficos dos extratos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* foram comparados, e as Figuras 3 e 4 ilustram os resultados obtidos com os extratos preparados a partir de material integral e avaliados por UHPLC/PAD.

A partir do perfil cromatográfico da *C. juncea* (Figura 3) é possível notar que há eluição de compostos ao longo de toda faixa de separação, o que indica a ocorrência de compostos com variada polaridade. No comparativo entre os cromatogramas nota-se grande similaridade dos perfis, sendo as principais diferenças de ordem quantitativa, ou seja, intensidade dos picos eluídos entre os diferentes extratos. A única exceção nesse caso foi a ocorrência de dois picos cromatográficos ($t_R = 4,700$ min e $4,900$ min) que ocorrem apenas no extrato obtido pelo processo de refluxo aquoso.

Em *C. juncea*, os dados espectrais de UV indicam a ocorrência de aminoácidos ($t_R = 1,384$ min), nucleotídeos como a guanosina ($t_R = 0,742$ min; $8,180$ min e $8,469$ min), substâncias contendo fenilalanina ($t_R = 1,432$ min), flavonoides ($t_R = 3,149$ min; $3,234$ min; $3,487$ min e $15,556$ min), alcaloides ($t_R = 3,681$ min) e derivados do ácido hidroxicinâmico ($t_R = 4,204$ min; $6,274$ min e $8,469$ min). Todas essas classes de metabólitos foram observadas em estudos preliminares realizados pelo grupo (Melo et al., 2021).

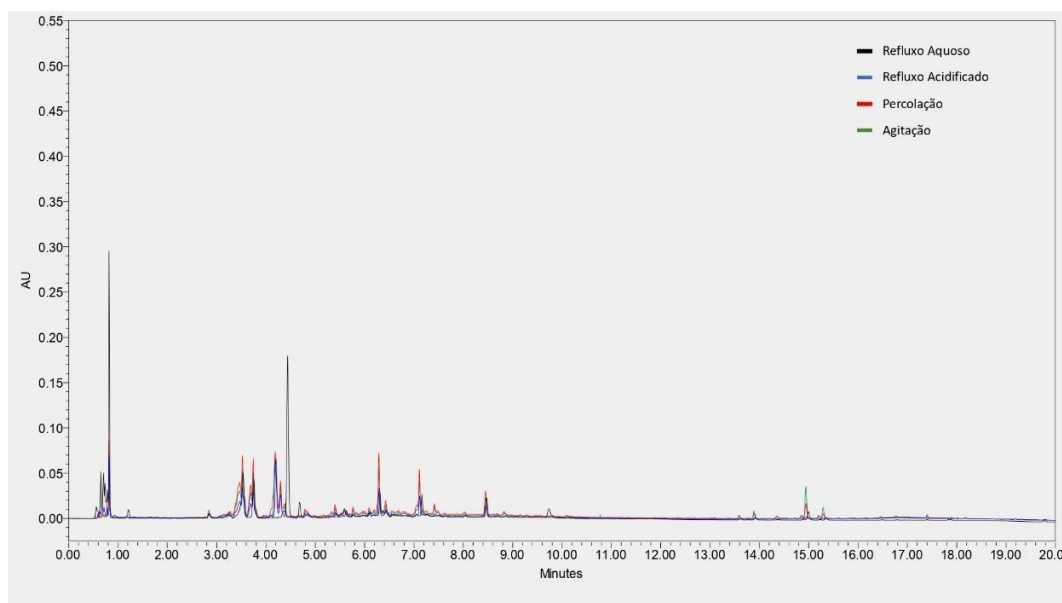


Figura 3. Cromatogramas obtidos por UHPLC/PAD (290 nm) para extratos das sementes de *C. juncea* usando a granulometria integral.

Quanto aos perfis cromatográficos de *C. ochroleuca* (Figura 4), observa-se que a intensidade dos compostos é muito maior do que aquela observada nos perfis de *C. juncea* (Figura 3), o que indica haver maior teor desses compostos nos respectivos extratos de *C. ochroleuca*. Embora haja muita semelhança entre os perfis cromatográficos, percebe-se ainda que os compostos mais apolares, eluídos entre $t_R = 13,500$ min e $15,000$ min, não ocorrem nos extratos de *C. ochroleuca* (Figura 4) como ocorrem em *C. juncea* (Figura 3). A única diferença observada foi para o pico eluído em $t_R = 3,110$ min, exclusivo para o extrato obtido pelo processo por refluxo aquoso.

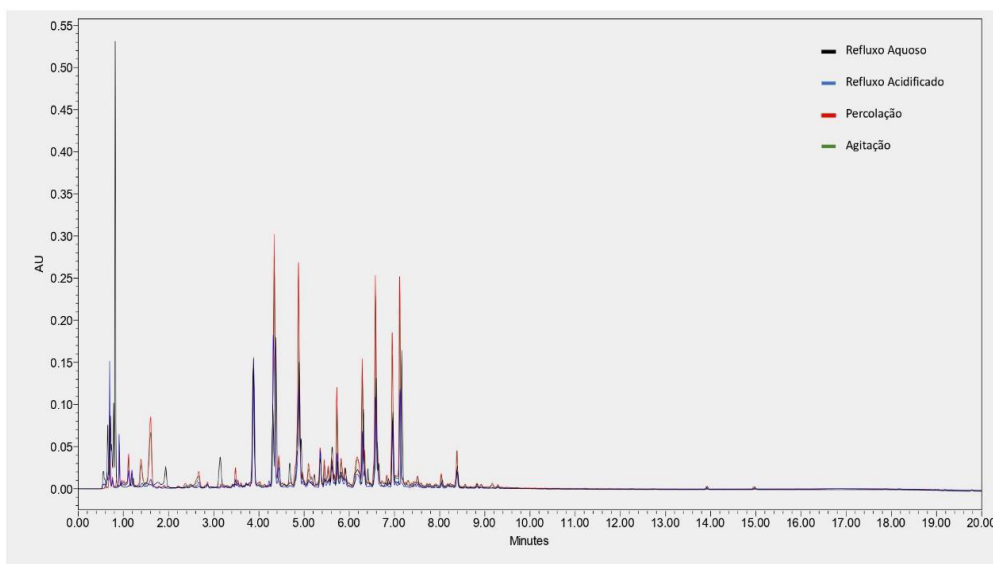


Figura 4. Cromatogramas obtidos por UHPLC/PAD (290 nm) para extratos das sementes de *C. ochroleuca* usando a granulometria integral.

Na avaliação dos espectros de UV de *C. ochroleuca*, é possível verificar que há a ocorrência das mesmas classes químicas citadas para a *C. juncea*. Na faixa de $t_R = 0,00$ min a $t_R = 3,00$ min, estão destacados os compostos químicos mais polares, sendo identificada em $t_R = 0,575$ min; 0,660 min; 0,784 min e 0,869 min a presença de alcaloides. Em $t_R = 0,997$ min, 1,207 min e 5,007 min, foram identificadas substâncias similares a fenilalanina; derivados do nucleotídeo guanossina foram sugeridos em $t_R = 1,335$ min; e absorção UV compatível com a classe de flavonoides foi observada em $t_R = 4,879$ min; 4,964 min; 5,724 min; 6,949 min; 6,992 min e 8,384 min. Também foram identificados, em $t_R = 1,459$ min; 1,587 min; 3,909 min; 4,374 min; 4,922 min; 5,599 min; 6,359 min; 6,569 min; 6,612 min e 7,119 min, derivados do ácido hidroxicinâmico e, em $t_R = 4,460$ min, foi observado espectro UV compatível com o aminoácido triptofano.

Conclusão

Os extratos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* apresentaram, de maneira geral, maiores rendimentos para as extrações realizadas pelos processos com refluxo aquoso e refluxo aquoso acidificado. A avaliação dos rendimentos obtidos indicou que há diferença estatística entre os intratamentos que forneceram as melhores respostas de recuperação de extrativos. A comparação dos perfis cromatográficos revelou que *C. ochroleuca* apresenta um conjunto maior de metabólitos eluídos no intervalo de t_R entre 0,045 min e 10,000 min. Esses metabólitos também são mais intensos do que aqueles observados nos perfis cromatográficos de *C. juncea*, sugerindo que seus teores sejam maiores nos extratos de *C. ochroleuca*. Essas informações indicam que a *C. ochroleuca* pode ser a espécie mais promissora para etapas futuras.

Referências bibliográficas

MAUAD, M.; SANTANA, R. S.; CARLI, T. H.; CARLI, F.; VITORINO, A. C. T.; MUSSURY, R. M.; RECH, J. Dry matter production and nutrient accumulation in *Crotalaria spectabilis* shoots. *Journal of Plant Nutrition*, v. 42, n. 6 p. 615-625. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1567779>

MELO, R. W. N.; FEITOSA, J. G.; ANDREANI, L.; RIBEIRO, J. A. A.; RODRIGUES, C.M. Estudo metabolômico de *Crotalaria juncea* por cromatografia de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA E SUSTENTABILIDADE, 1. 2021.

Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/225290/1/Estudo-metabolo770mico-de-Crotalaria-2021.pdf>. Acesso em 19 set. 2023.

PÉREZ-ALONSO, N.; JIMÉNEZ, E. L. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. **Biotecnología Vegetal**, v. 11, n. 4, p. 195-211, 2011. Disponível em: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>. Acesso em: 10 set. 2023.

SCHWAN, A.V. **Antagonismo de espécies de Crotalaria ao nematoide de cisto da soja: heterodera glycines ichinohe**. 2003. 59 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados, 2003. Disponível em: <https://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-DOUTORADO-AGRONOMIA/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Adriana%20Viana%20Schwan.pdf>. Acesso em: 19 set. 2023.