

# 1º Encontro Nacional de Química e Sustentabilidade

 14 a 15 de Julho de 2021

Estudo metabolômico de Crotalaria juncea por Cromatografia de Ultra Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

Estudo metabolômico de Crotalaria juncea por Cromatografia de Ultra ...



Área

Produção de produtos químicos de alto valor agregado a partir de fontes renováveis



## Autores

Melo, R.W.N. (UCB) ; Feitosa, J.G. (UNB) ; Andreani, L. (EMBRAPA) ; Ribeiro, J.A.A. (EMBRAPA) ; Rodrigues, C.M. (EMBRAPA)

## Resumo

O gênero *Crotalaria* possui, em geral, alcaloides de elevada toxicidade aos vertebrados. *Crotalaria juncea* é uma das espécies desta família e tem sido utilizada na adubação verde e no controle de pragas. Com isso, surge o interesse em identificar os principais metabólitos secundários presentes em extratos de sementes de *C. juncea*. Este trabalho utilizou cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-ESI-qTOF-MS/MS) no modo positivo e negativo, identificando compostos ativos tais como flavonoides, derivados do ácido hidroxicinâmico e alcaloides. As informações obtidas auxiliarão na aplicação desta espécie vegetal na proposição de novos biocidas naturais.

## Palavras chaves

*Crotalaria*; extrato hidroalcoólico; metabólitos secundários

## Introdução

Atualmente, há grande interesse na substituição de produtos derivados da indústria petroquímica por alternativas renováveis visando à redução de danos à saúde humana, animal e também ao ambiente. Extratos vegetais podem ser utilizados em variadas aplicações, tais como inseticidas naturais, antifúngicos, antioxidantes, uso medicinal, entre outras. Sendo assim, faz-se necessária a busca de extratos de origem natural que possuam metabólitos secundários com atividade aplicada para estes fins. A *Crotalaria juncea* é uma planta originária da Índia, que é muito utilizada na adubação verde e também no controle de pragas, por não apresentar muita exigência em relação à fertilidade do solo, além de possuir grande potencial na fixação de nitrogênio (ARAÚJO; SANTANA; ESPÍRITO-SANTO, p. 109, 2011) (BOMFIM-SILVA et al, p. 372, 2011). Plantas pertencentes ao gênero *Crotalaria* apresentam alcaloides pirrolizidínicos em suas sementes e em suas folhas (GARDIANO et al, p. 3, 2010). Com isso, a busca por metabólitos secundários provenientes de *C. juncea*, que possam ser utilizados no controle de diversas pragas, especialmente na formulação de inseticidas para aplicação em culturas agrícolas (WANG; SIPES; SCHMITT, p. 37, 2002), é um tema de grande interesse. Ademais, alguns desses alcaloides podem apresentar alta toxicidade aos vertebrados. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar os principais metabólitos secundários presentes em extrato hidroalcoólico de sementes de *C. juncea* por meio de análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. Este estudo contribui para o aumento do conhecimento a respeito desta espécie, auxiliando na estratégia de aplicação desses extratos na formulação de biocidas naturais em estudos futuros.

## Material e métodos

A preparação do extrato hidroalcoólico de *C. juncea* foi avaliado em outro trabalho apresentado neste evento (Feitosa, J.). A fração de 299-250  $\mu\text{m}$  foi selecionada para os ensaios de extração devido ao perfil cromatográfico apresentado em UHPLC/PDA (dados não apresentados). Os extratos hidroalcoólicos foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência (Nexera XL, Shimadzu

Inc.) acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (Maxis 4G, Bruker Daltonics) (UHPLC-ESI-qTOF-MS/MS). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: coluna Acquity UPLC HSS-T3 150 x 2.1 mm, 1.8 µm (Waters Corporation), mantida a 40°C; volume de injeção: 1 µL; vazão da fase móvel: 0,4 mL/min; fase móvel A – água deionizada com ácido fórmico 0,1% e B – ACN/MeOH 70/30 com ácido fórmico 0,1%; modo de eluição gradiente (proporção A/B): linear de 100/0 a 75/25 (0 a 12 min), 75/25 a 50/50 (12 a 17 min), isocrático 0/100 (20 a 22 min) e isocrático 100/0 (22 a 28 min) para reequilíbrio da coluna. O espectrômetro de massas foi operado em ambas as polaridades, utilizando os seguintes parâmetros: end plate: 500 V; capillary: 3.800 V (positivo) ou 4.200 V (negativo); dry gas: 9,0 L/min; dry temperature: 200°C; e m/z 70-1000. Os espectros foram processados utilizando o software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics) e as massas detectadas com intensidade absoluta superior a  $1 \times 10^4$  counts foram identificadas putativamente. As fórmulas moleculares dos compostos com m/z de interesse foram obtidas utilizando a ferramenta SmartFormula, e submetidas às bases de dados (KEGG e CheBI) para identificação preditiva preliminar. Posteriormente, os padrões de fragmentação foram avaliados no banco de dados MetFrag para confirmação da identidade dos compostos.

## Resultado e discussão

A análise por UHPLC-ESI-qTOF-MS/MS detectou 26 picos em modo negativo e 35 picos em modo positivo (Figura 1). No entanto, não foi possível realizar a atribuição putativa para todos os picos detectados, pois nem todos apresentaram fragmentação de segundo estágio adequada (MS2). Diversos compostos com atividade biológica promissora foram identificados e estão apresentados na Tabela 1. Os aminoácidos (4S)-4-Hidroxi-L-isoleucina (entrada 1), ácido glutâmico (entrada 11), ácido antranílico (entrada 14) e derivados do aminoácido arginina (entrada 8) e isoleucina (entrada 17), foram detectados em ambas polaridades. As flavonas, compostos com atividade antioxidante, estão detalhadas nas entradas 2, 3, 4, 6 e 7 (modo negativo) e 18, 19, 20 e 21 (modo positivo). Entre as flavonas, a quercetina 3-O-beta-D-glucosil-(1->2)-beta-D-glucosídeo foi detectada em ambas polaridades, assim como o canferol-3-O-beta-D-glucosil-(1->2)-beta-D-glucosídeo. O ácido faseólico, da classe dos ácidos hidroxicinâmicos (entrada 5), apresenta grande potencial como agente antioxidante. Os alcaloides, que podem ser utilizados em formulações de inseticidas, estão detalhados nas entradas 9 e 10 (ismina), 13 (heliotridina), 22, 24 e 25 (supinina) e 23 (rosmarinina). Destacam-se a heliotridina e a supinina, alcaloides pirrolizidínicos que possuem, de forma geral, efeitos tóxicos reconhecidos. Observa-se ainda a presença de levofuraltadona (entrada 12) e licoricidina (entrada 26), ambos com atividade antibactericida. Um triterpenoide derivado da saponina com provável atividade inseticida (entrada 27) também foi identificado como componente do extrato de *C. juncea*. Por fim, os oligossacarídeos kojibiose (entrada 16) e rafinose (entrada 15) compõem o extrato estudado.

Figura 1



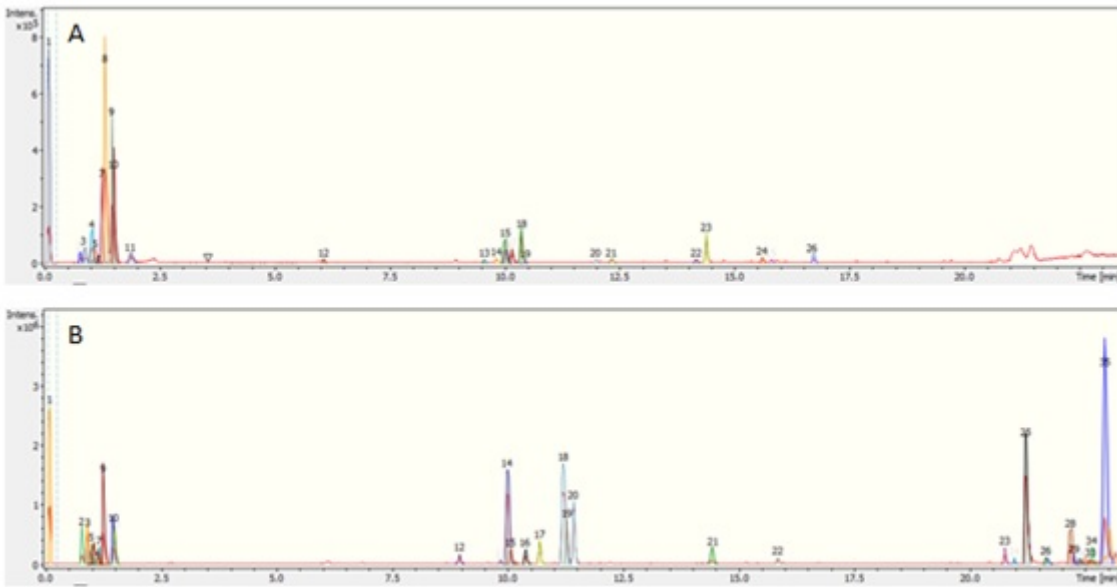


Figura 1. Perfil dissect dos cromatogramas de UHPLC-ESI-MS/MS no modo negativo (A) e positivo (B) do extrato bruto hidroalcoólico de *C. juncea*.

Perfil dissect dos cromatogramas de UHPLC-ESI-MS/MS no modo negativo (A) e positivo (B) do extrato bruto de *C. juncea*.

Tabela 1

Entrada	Composto Químico	Formela molecular	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Fragmentos MS <sup>2</sup> [% Intensidade relativa]
<b>Modo negativo</b>					
1	14S-4-1,1-dioxol-2-olactona	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1,255	146,3824	84,045 (54,1), 85,0620 (51,5), 100,0744 (62,6)
2	Quercetina 3-O-beta-L-glucosil-(1->2)-beta-D-galactosil	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	9,818	623,1414	342,3582 (34,3), 343,3449 (30,3), 372,0347 (18,1), 606,0063 (32,5), 636,1103 (21,2)
3	3-((2S,3R)-6-((R)-4R,5R)-3,4-dihydroxy-3-methyl-5-((2S,4S,3R)-3,4-dihydroxybutan-2-ylideneoxy)pyrrolidin-2-yl)oxy-methyl)-3,4,5-trihydroxybenzoylpyran-2-yl)oxy-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-ona	C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> O <sub>16</sub>	10,034	755,2653	525,0444 (11,7), 626,1358 (86,5), 636,1981 (18,9)
4	Luceína-2	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	10,072	609,1470	320,0427 (35,8), 327,051 (23,4), 440,065 (23,9), 469,104 (89,9)
5	Ácido ferasóico	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	10,160	295,2163	67,0085 (19,1), 119,0426 (100,0), 162,0096 (54,9)
6	Carfenterol-3-O-beta-D-glucosil-(1->2)-beta-D-glucosidato	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	10,370	609,1470	313,0335 (11,0), 326,043 (19,1), 327,051 (11,0), 460,0338 (15,7), 469,1342 (40,3), 509,077 (100,0)
7	Scifalavonina B + 7 isômeros	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	10,743	339,1250	
<b>Modo positivo</b>					
8	Aminossido derivado da arginina	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	0,910	174,1162	88,0789 (16,1), 88,0886 (15,0), 112,0872 (14,8), 116,0701 (37,1), 98,0917 (11,3), 166,0573 (11,1)
9	fenina	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	0,970	258,1102	
10	fenina	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	1,006	259,1103	166,0623 (16,4)
11	Ácido Galâmico + 8 isômeros	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1,006	340,2601	84,0442 (100,0)
12	Leucanetobose	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1,009	325,1120	05,0267 (100), 146,0602 (86,7)
13	Helictidina	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,089	358,1017	80,0489 (32,2), 82,065 (-6,0), 88,0589 (25,4), 93,0589 (13,3), 94,0648 (-7,3), 50,0805 (17,3), 146,0604 (55,2), 112,0747 (48,5), 26,0301 (21,2), 138,0305 (33,8)
14	Ácido entranílico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,163	300,3540	70,0234 (21,0), 70,0417 (10,6), 92,0424 (80,6), 93,0650 (23,1), 94,080 (80,0), 95,0443 (16,2), 110,0389 (40,3), 26,0468 (19,8)
15	Rafinose + 8 isômeros	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	1,466	509,1767	65,0293 (37,5), 91,0395 (150,0), 145,0491 (65,0), 163,0597 (56,8), 325,1177 (16,7)
16	Kojibiose + 1 isômero	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	1,606	343,1233	86,0275 (61,0), 89,0386 (100,0), 146,0602 (66,7)
17	3-(2-Metilbutiril)-dihidroisemida	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	1,506	210,1498	84,0995 (23,2), 92,0498 (32,3), 214,281 (77,2)
18	Quercetina 3-O-beta-L-glucosil-(1->2)-beta-D-glucosil	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	9,857	627,1967	315,3088 (12,4), 327,0467 (16,3), 345,0504 (56,8), 420,0815 (18,0), 447,0623 (28,5), 465,1028 (53,6), 329,0657 (21,4), 431,0978 (12,5), 449,1067 (100,0), 611,1529 (12,8)
19	4,5-dihidro-6-(hidroximetil)-3-[[2S,3S,5R)-3,4,5-triaxio-3-metil-tetrahidropiran-2-il]oximetil-oxiran-2-il]oximetil-3,4,5-triaxio-2,4-diol-2,4-dihidro-2,4-dioxoleno-2-ona + 1 isômero	C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> O <sub>16</sub>	10,077	611,1625	329,0657 (33,1), 473,0815 (17,0), 431,089 (27,6), 449,1064 (100,0)
20	Carfenterol-3-O-beta-D-glucosil-(1->2)-beta-D-glucosil	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	10,402	611,1631	288,0547 (17,5), 311,0545 (11,4), 329,0367 (58,6), 413,0671 (20,5), 431,0973 (20,6), 449,1067 (100,0)
21	Carfenterol-3-O-beta-D-glucosil-(1->2)-beta-D-glucosil	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	10,681	284,1863	94,0661 (31,7), 138,08 (-42,2), 138,0876 (11,9)
22	Suprina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	11,275	354,1941	121,0883 (12,9), 222,1491 (69,3)
23	Suprina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	11,285	284,1865	64,0648 (100,0), 138,081 (45,1)
24	Suprina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	11,434	284,1867	64,0650 (100,0), 138,0814 (41,4)
25	Suprina	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	15,027	425,2260	95,0436 (36,6), 123,0436 (17,5), 135,0543 (32,2), 249,1121 (18,2)
26	Licoricidina	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	20,782	343,3300	85,0293 (23,4), 170,0544 (59,0), 147,0647 (20,5), 168,0284 (16,6), 203,1789 (31,0), 217,1916 (17,9), 221,1901 (15,0), 423,3025 (100,0), 441,3731 (90,3), 599,3956 (19,6)
27	Scyscaponina I	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>			

Metabólitos identificados em extrato hidroalcoólico de *C. juncea* por UHPLC-ESI-MS/MS nos modos negativo e positivo.

## Conclusões



Este estudo avaliou o extrato hidroalcoólico de sementes de *C. juncea* e identificou, em sua composição, a presença de diversos compostos com atividade antioxidante, inseticida e antibactericida. Dentre os compostos identificados destacam-se a heliotridina e a supinina, ambos alcaloides pirrolizidínicos, classe de compostos muito presente em plantas da família Fabaceae. Os resultados obtidos auxiliarão no direcionamento de estratégias de aplicação de extratos de *C. juncea* na busca por formulações comerciais voltadas ao controle de pragas agrícolas em estudos realizados pelo grupo de pesquisa.

## Agradecimentos

## Referências

ARAÚJO, Érica de Oliveira; SANTANA, Cássia do Nascimento; ESPÍRITO SANTO, Catarina Lima do. Potencial alelopático de extratos vegetais de *Crotalaria juncea* sobre a germinação de milho e feijão. *Rev. Bras. de Agroecologia*, v. 6, n. 1, p. 108-116, 2011.

BONFIM-SILVA, Edna Maria; SILVA, Tonny José Araújo da; GUIMARÃES, Salomão Lima; POLIZEL, Anny Castilho. Desenvolvimento e produção de crotalaria juncea adubada com cinza vegetal. *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, n. 13, p. 371-379, 2011.

GARDIANO, Cristiane Gonçalves; DALLEMOLE-GIARETTA, Rosângela; LOPES, Everaldo Antônio; ZOOCA, Ronaldo João Falcão; FERRAZ, Silamar; FREITAS, Leandro Grassi de. Atividade nematicida de extratos de sementes de espécies de *Crotalaria* sobre *Meloidogyne javanica*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n.1, p. 3-7, 2010.

WANG, Koon-Hui; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. *Nematropica*, v. 32, n. 1, p. 35-58, 2002.

## PATROCINADORES

---



(<http://crq3.org.br/>)

## APOIO

---



ABQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA.

☎ (21) 2224-4480    ✉ [abqeventos@abq.org.br](mailto:abqeventos@abq.org.br)

🌐 <https://www.abq.org.br> (<https://www.abq.org.br>)

