Caracterização química e avaliação nematotóxica de extratos hidroetanólicos de *Brassica carinata*

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo[1], Larissa Andreani[2], José Antônio de Aquino Ribeiro[3], Thales Lima Rocha[4], Bruno Galvêas Laviola[5], Clenilson Martins Rodrigues[6]

Resumo

Novos biocidas naturais, com princípios ativos mais específicos e ambientalmente seguros, têm sido estudados como uma forma de contrapor os efeitos ambientais negativos do uso de nematicidas sintéticos de amplo espectro. As espécies pertencentes à família *Brassicaceae*, tal como a *Brassica carinata*, são conhecidas por apresentarem diversos glicosinolatos em seus tecidos vegetais. Sendo assim, a caracterização química e a avaliação do potencial nematotóxico dessas espécies são relevantes para o potencial desenvolvimento de novos biocidas. Os extratos hidroetanólicos de *B. carinata* avaliados forneceram bons rendimentos de extrativos. A variedade NuJet 400 apresentou menor número de metabólitos em comparação com a variedade NuCover STH100. Os extratos apresentaram ação nematostática expressiva. No entanto, o efeito nematicida da variedade NuJet 400 foi mais pronunciado em relação ao da variedade NuCover STH100, provavelmente em razão de uma maior concentração de compostos ativos nessa amostra.

Termos para indexação: *Brassica carinata*, metaboloma vegetal, nematicidas naturais, avaliação nematotóxica.

Introdução

Os efeitos ambientais negativos do uso de nematicidas sintéticos de amplo espectro de atuação dão impulso à busca por estratégias de controle de pragas agrícolas que utilizem princípios ativos específicos e ambientalmente seguros. Entre as soluções estudadas, diversos estudos na literatura avaliam a utilização de espécies Brassicaceae como cultura de rotação, adubo verde ou farinhas desengorduradas de sementes no controle de pestes e patógenos do solo (Nicola et al., 2013; Curto et al., 2016).

A família Brassicaceae conta com mais de 3.500 espécies, dentre as quais encontra-se a *Brassica carinata*. As plantas dessa família apresentam, em seus tecidos vegetais, cerca de 200 glicosinolatos que se diferenciam quanto à sua cadeia lateral orgânica: alifática, aromática ou heteroaromática (Curto et al., 2016). Esses glicosinolatos, quando em contato com a enzima endógena mirosinase, sofrem hidrólise, gerando cianetos orgânicos e isotiocianatos, compostos tóxicos para um grande número de fitopatógenos (D'Addabbo et al., 2020). Como a ação biocida de compostos ativos é dependente do perfil e da concentração desses compostos, que por sua vez variam conforme as espécies vegetais e os tecidos analisados, a caracterização química e a avaliação do potencial nematotóxico de diferentes espécies da família Brassicaceae são relevantes para o desenvolvimento de novos defensivos de origem renovável.

[1] Graduado em Química, Embrapa Agroenergia, rodwesley1995@gmail.com
[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] Biólogo, doutor em Bioquímica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, thales.rocha@embrapa.br
[5] Agrônomo, doutor em Fitotecnia, Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br
[6] Químico, doutor em Química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil químico de extratos de *B. carinata* e avaliar seu potencial nematotóxico contra juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, também conhecido como nematoide-das-galhas. Este fitonematoide, um dos mais comuns no Brasil, é responsável por severas perdas nas culturas da soja, do algodão, do café, do feijão, do milho e da cana-de-açúcar, com perdas anuais estimadas em R$ 15 bilhões somente para a cultura da soja.

Materiais e métodos

Extração hidroetanólica - Esse processo foi avaliado em escala laboratorial empregando as variedades comerciais NuJet 400 e NuCover STH100 de sementes de *B. carinata* (fornecedor: Nuseed). As sementes foram secas até massa constante e foram moídas. Em sequência, as amostras passaram por processo de extração hidroalcóolica (não detalhada por questões de sigilo). Após a extração, os sobrenadantes foram filtrados por gravidade, rotaevaporados para a retirada do etanol, congelados e liofilizados. A massa resultante após processo de liofilização foi utilizada para a determinação do rendimento da extração (realizado em triplicata).

Atividade nematotóxica - Testes in vitro avaliaram a atividade nematotóxica dos extratos hidroetanólicos de *B. carinata* contra juvenis de segundo estádio (J2) de *M. incognita* obtidos a partir de ovos extraídos de raízes de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os testes foram realizados em triplicata e utilizaram água destilada e DMSO como controles negativos e etanol como controle positivo. Inicialmente, foi preparada solução estoque (50 mg/mL) de cada amostra utilizando DMSO para a solubilização. Foram transferidos 20 µL de cada solução estoque para um microcubo contendo: a) solução com 70 J2 e b) água destilada suficiente para completar 1 mL de solução total. Os microtubos foram homogeneizados e mantidos em temperatura ambiente sob proteção de luz. Após 48 horas, com auxílio de microscópio ótico e câmara de contagem de Peters, foi realizada a contagem dos J2 paralisados. Em seguida, foi realizado o "teste de recuperação", com o objetivo de verificar a atividade nematicida ou nematostática dos extratos avaliados. As amostras foram centrifugadas de 650 a 700 x g com posterior retirada do sobrenadante e adição sequencial de água para enxague dos fitonematoides, processo que foi repetido por três vezes para garantir a remoção dos compostos nematicidas da solução. Por fim, os microtubos com fitonematoides foram mantidos em temperatura ambiente por mais 24 horas. Ao término desse período, a partir de observação em microscópio ótico, foram considerados mortos os fitonematoides que permaneceram paralisados (ação nematicida) e considerados paralisados os nematoides que recobraram a movimentação (ação nematostática).

Caracterização química por UHPLC-PAD e UHPLC-HRMS/MS - Análises por UHPLC-PAD foram realizadas em coluna cromatográfica Acquity UHPLC HSS-T3 RP18 (1,8 µm, 2,1 mm x 150 mm) na temperatura de 40 °C e volume de injeção de 1 µL. O gradiente de separação empregado foi composto pelas fases móvel: A1: H_2O + ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% e B1: Acetonitrila + TFA 0,05%, com tempo total de análise de 32 min. A varredura foi realizada no intervalo de 200 nm a 400 nm e em quatro canais 2D (210 nm, 254 nm, 280 nm e 330 nm). Amostras também foram analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF-MS MaXis 4G (Bruker), operado em modo de ionização positiva (ESI-(+)-MS/MS) e negativa (ESI-(-)-MS/MS). Os parâmetros instrumentais utilizados foram tensão capilar: 3.800 V; pressão do nebulizador: 4,0 bar; temperatura da fonte: 200 °C; e fluxo de gás N_2: 9,0 L/min. A separação dos compostos foi realizada em UHPLC (Nexera X2, Shimadzu) com coluna cromatográfica de fase reversa HSS-T3 (2,1 mm x 150 mm, 1,8 µm, Waters) e temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de A: H_2O + 0,1% ácido fórmico e B: acetonitrila + 0,1% ácido fórmico. O sistema de eluição empregou programação em modo gradiente linear com tempo total de 25 min., sendo iniciado com 100% da fase A e vazão de 400 µL/min.

Resultados e discussão

A extração hidroetanólica apresentou rendimento de 18,10 ± 0,18% para a variedade comercial NuJet 400 e 16,81 ± 0,22% para a NuCover STH100. Esses resultados estão próximos ao observado para amostra de crambe (18,60 ± 1,59%) e são inferiores à extração hidroetanólica de canola (24,37 ± 1,79%), espécies de Brassica avaliadas anteriormente pelo grupo. A avaliação de atividade nematotóxica, por sua vez, indicou que ambas as amostras possuíam efeito nematostático, apresentando 100,00 ± 0,00% e 98,81 ± 2,06% de fitonematoides paralisados para os extratos das variedades NuJet400 e NuCover STH100, respectivamente. O extrato de *B. carinata* NuJet 400, no entanto, apresentou efeito nematicida mais pronunciado (98,06 ± 1,81%) em comparação com o extrato de *B. carinata* STH100 (80,20 ± 8,65%).

Técnicas analíticas de caraterização foram utilizadas na avaliação de metabólitos com grupos cromóforos por UHPLC-PAD, revelando que os extratos hidroetanólicos das duas variedades comerciais de *B. carinata* apresentavam complexa composição química com inúmeras bandas cromatográficas registradas nas análises. A Figura 1 apresenta os cromatogramas obtidos para as amostras avaliadas em 210 nm. No entanto, cromatogramas dos extratos em 254 nm, 280 nm e 330 nm (não mostrados) também foram levados em consideração para a avaliação do perfil químico do material. Os metabólitos detectados eluíram majoritariamente na porção inicial dos cromatogramas (t_R entre 1 min. e 11 min.), indicando que os extratos são compostos, em sua maioria, por moléculas polares. Observou-se que o extrato da variedade NuJet 400 (Figura 1A) apresentou dois compostos majoritários e muito intensos (λ = 210 nm, t_R = 1,441 min. e 7,560 min.). A avaliação do perfil espectral da amostra (espectros UV não mostrados) indicou a ocorrência de compostos fenólicos, aminoácidos, flavonóis e flavonas. Além disso, foram observados picos cromatográficos com perfil UV similar ao da amina alcaloidal sinapina. Já a variedade NuCover STH100 (Figura 1B) apresentou extrato com picos cromatográficos menos intensos, mas com uma maior distribuição de metabólitos, destacando-se quatro compostos majoritários (λ = 210 nm, t_R = 1,445 min., 7,550 min., 8,351 min. e 9,200 min.). O perfil espectral dos picos cromatográficos eluídos sugeriu a ocorrência de compostos fenólicos, derivados do ácido sinapílico, aminoácidos, flavonas e, como observado para a variedade NuJet 400, picos cromatográficos com o perfil UV similar ao da amina alcaloidal sinapina.

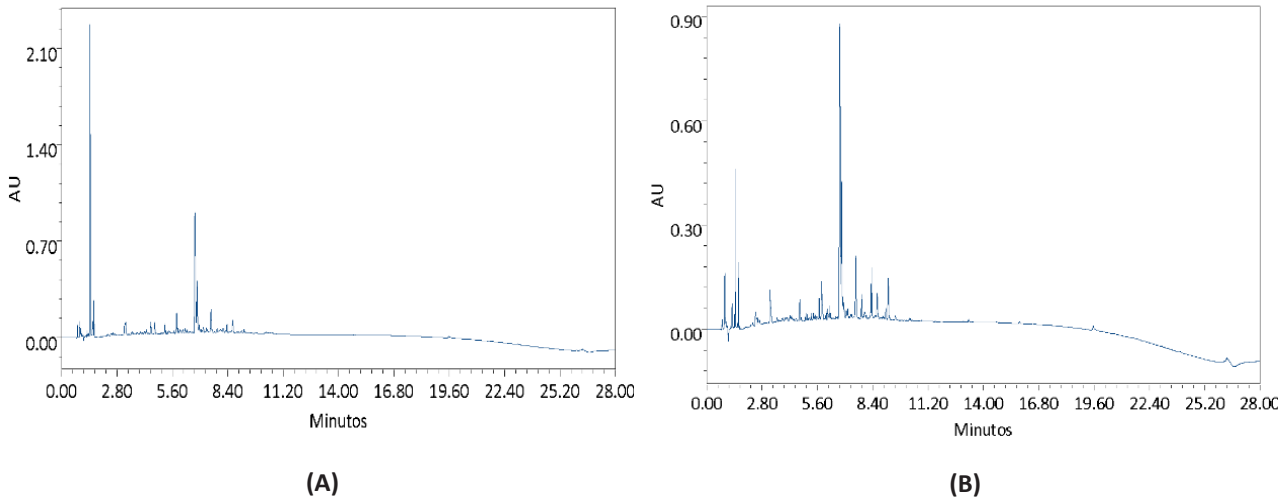

Figura 1. Cromatogramas obtidos por UHPLC-PAD para os extratos hidroetanólicos das sementes de *Brassica carinata* (A) Nujet 400 e (B) NuCover STH100 em 210 nm.

A caracterização metabolômica por UHPLC-HRMS/MS do extrato hidroetanólico das sementes de *B. carinata*, variedade NuJet 400, detectou 29 picos pertencentes a íons precursores no

modo positivo e 13 no modo negativo, após os tratamentos de *deconvolution* e *dissect* (cromatogramas não apresentados). Esses íons precursores foram fragmentados e seus perfis de alta resolução foram contrastados com bancos de dados, o que resultou na indicação de compostos compatíveis com o perfil de fragmentação observado. A Tabela 1 destaca alguns dos compostos atribuídos putativamente.

Tabela 1. Metabólitos identificados de forma putativa a partir de análises de UHPLC-HRMS/MS para o extrato de sementes de *B. carinata*, variedade NuJet 400.

Entrada	Tempo de retenção (t_R, min.)	Razão m/z e massa neutra	FM iônica e neutra (Da)	Composto provável
		Modo positivo		
1	0,680	175,1198 174,1120	$C_6H_{15}N_4O_2^+$ $C_6H_{14}N_4O_2$	Arginina
2	0,710	133,0612 132,0535	$C_4H_9N_2O_3^+$ $C_4H_8N_2O_3$	Asparagina
3	0,900	325,1159 324,1070	$C_{13}H_{17}N_4O_6^+$ $C_{13}H_{16}N_4O_6$	Levofuraltadona
4	1,020	295,0964 294,0890	$C_{18}H_{15}O_4^+$ $C_{18}H_{14}O_4$	Dehidrocicloguanandina
5	3,130	268,1040 267,0970	$C_{10}H_{14}N_5O_4^+$ $C_{10}H_{13}N_5O_4$	Adenosina
		Modo negativo		
6	0,770	195,0513 196,0580	$C_6H_{11}O_7^-$ $C_6H_{12}O_7$	Ácido glucônico
7	0,990	133,0140 134,0215	$C_4H_5O_5^-$ $C_4H_6O_5$	Ácido málico
8	1,200	358,0280 359,0340	$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$ $C_{10}H_{17}NO_9S_2$	Sinigrina
9	1,710	358,0275 359,0340	$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$ $C_{10}H_{17}NO_9S_2$	Sinigrina
10	3,540	463,0486 464,0560	$C_{16}H_{19}N_2O_{10}S_2^-$ $C_{16}H_{20}N_2O_{10}S_2$	4-Hidroxiglucobrassicina
11	4,540	447,0539 448,0610	$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2^-$ $C_{16}H_{20}N_2O_9S_2$	Glucobrassicina

A caracterização metabolômica do extrato hidroetanólico das sementes de *B. carinata*, variedade NuCover STH100, indicou 33 picos pertencentes a íons precursores no modo positivo e 18 no modo negativo, após os tratamentos de *deconvolution* e *dissect* (não apresentados). Esses íons precursores foram fragmentados e seus perfis de alta resolução foram contrastados com bancos de dados, entre os quais destacam-se os compostos putativamente atribuídos na Tabela 2.

Em ambas as amostras, observou-se a presença de aminoácidos e nucleosídeos (entradas 1, 2 e 5 – Tabela 1; 2 e 3 – Tabela 2), compostos com ação biocida reconhecida (entradas 3 e 4 – Tabela 1; 1 e 4 – Tabela 2), ácidos carboxílicos (entradas 6 e 7 – Tabela 1; 5 e 6 – Tabela 2) e glicosinolatos e seus derivados (entradas 8 a 11 – Tabela 1; 7 a 9 – Tabela 2). Também foram identificadas moléculas com grupamentos cianeto. Destaca-se que a identificação do glicosinolato sinigrina para os extratos de *B. carinata* está de acordo com os estudos realizados por Curto et al. (2016).

Tabela 2. Metabólitos identificados de forma putativa a partir de análises de UHPLC-HRMS/MS para o extrato de sementes de *B. carinata*, variedade NuCover STH100.

Entrada	Tempo de retenção (t_R, min.)	Razão m/z e massa neutra	FM iônica e neutra (Da)	Composto provável
		Modo positivo		
1	0,800	266,1233 265,1170	$C_{11}H_{16}N_5O_3^+$ $C_{11}H_{15}N_5O_3$	2'-Deoxi-N^6-metiladenosina
2	2,990	268,1030 267,0970	$C_{10}H_{14}N_5O_4^+$ $C_{10}H_{13}N_5O_4$	Adenosina
3	4,340	205,0982 204,0900	$C_{11}H_{13}N_2O_2^+$ $C_{11}H_{12}N_2O_2$	Triptofano
4	6,420	486,1479 485,1430	$C_{23}H_{24}N_3O_9^+$ $C_{23}H_{23}N_3O_9$	Nocardicina D
		Modo negativo		
5	0,760	195,0515 196,0580	$C_6H_{11}O_7^-$ $C_6H_{12}O_7$	Ácido glucônico
6	1,010	133,0146 134,0220	$C_4H_5O_5^-$ $C_4H_6O_5$	Ácido málico
7	1,200	358,0285 359,0340	$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$ $C_{10}H_{17}NO_9S_2$	Sinigrina
8	1,700	358,0282 359,0340	$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$ $C_{10}H_{17}NO_9S_2$	Sinigrina
9	4,410	463,0502 464,0560	$C_{16}H_{19}N_2O_{10}S_2^-$ $C_{16}H_{20}N_2O_{10}S_2$	4-Hidroxiglucobrassicina

Conclusão

Os extratos hidroetanólicos de *B. carinata* forneceram bons rendimentos em termos de seus extrativos e respostas expressivas quanto ao efeito de paralisação dos fitonematoides. Quanto ao efeito nematicida, o extrato da variedade NuJet 400 foi mais efetivo em relação ao extrato da variedade NuCover STH100. Do ponto de vista da composição química, a variedade NuJet 400, em comparação com a NuCover STH100, apresentou menor número de metabólitos que absorvem na região do ultravioleta, bem como menor quantidade de metabólitos atribuídos por UHPLC-HRMS/MS. No entanto, a análise metabolômica indicou maior variedade de glicosinolatos para o extrato de *B. carinata* NuJet 400. Além disso, os metabólitos majoritários observados para essa amostra são mais intensos, o que indica que estão presentes em maior dose, e essa característica pode ter resultado em seu efeito nematicida mais pronunciado. Também foram identificados compostos que apresentam inúmeros relatos associados com suas funções biológicas, contribuindo para a ação nematotóxica dos extratos avaliados.

Referências bibliográficas

CURTO, G.; DALLAVALLE, E.; MATTEO, R.; LAZZERI, L. Biofumigant effect of new defatted seed meals against the southern root-knot nematode, Meloidogyne incognita. **Annals of Applied Biology**, v. 169, n. 1, p. 17-26, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1111/aab.12275. Acesso em: 26/09/2023

D'ADDABBO, T.; MIGUNOVA, V. D.; RENCO, M.; SASANELLI, N. Suppressiveness of soil amendments with pelleted plant materials on the root-knot nematode Meloidogyne incognita. **Helminthologia**, v. 57, n. 4, p. 376-383, 2020.

NICOLA, G. R. de; D'AVINO, L.; CURTO, G.; MALAGUTI, L.; UGOLINI, L.; CINTI, S.; PATALANO, G.; LAZZERI, L. A new biobased liquid formulation with biofumigant and fertilising properties for drip irrigation distribution. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 113-118, 2013.