

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**PERFIL METABOLÔMICO DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
CROTALÁRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA**

Tainá Silva Figueiredo
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

TAINÁ SILVA FIGUEIREDO

**PERFIL METABOLÔMICO DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
CROTALÁRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Elson S. de Alvarenga

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F475p
2025

Figueiredo, Tainá Silva, 1999-

Perfil metabolômico de sementes de diferentes espécies de crotalaria e avaliação da atividade herbicida: estudo dos metabólitos bioativos de sementes de crotalaria e seu papel no manejo sustentável de plantas invasoras / Tainá Silva Figueiredo. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Elson Santiago de Alvarenga.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 2025.

Referências bibliográficas: f. 77-82.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.637>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Crotalaria - Semente. 2. Metabolômica. 3. Alcalóides de pirrolizidina. 4. Monocrotalina. 5. Produtos naturais.
I. Alvarenga, Elson Santiago de, 1967-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 547.7

TAINÁ SILVA FIGUEIREDO

**PERFIL METABOLÔMICO DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
CROTALÁRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de julho de 2025.

Assentimento:

Tainá Silva Figueiredo
Autora

Elson Santiago de Alvarenga
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 03/10/2025 às 21:27:12 e pelo orientador em 04/10/2025 às 07:37:17. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **NJYG.Y3Y9.FLQR** e clique no botão 'Validar documento'.

*À Deus,
aos meus pais, Nilcéia e Remilson,
e a minha irmã, Yasmin.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Remilson, por ser minha inspiração como profissional e por todos os ensinamentos e conversas trocadas durante esses anos.

À minha mãe, Nilcéia, por todo cuidado e apoio emocional durante a minha trajetória.

À minha irmã Yasmin, por todo carinho, amizade e parceria.

À minha família de Viçosa por todo cuidado durante esses anos, em especial aos meus avós, Zeca e Dé, meu eterno agradecimento e à minha madrinha, Márcia.

À minha família de Castelo, por se fazerem presentes mesmo de longe, em especial meu padrinho Romário, meu avô Remy, prima Geisa e minha avó Arlette, mesmo não estando mais presente fisicamente.

Ao meu namorado Atilio por todo carinho, afeto, palavras de apoio e paciência.

Ao professor Elson pela orientação, confiança e ensinamentos. Ao professor Demuner pelos ensinamentos e conselhos e por todo apoio dado durante toda a minha jornada na UFV.

Aos membros da banca Guilherme, Demuner e Marcelo por aceitarem o convite e por todas as contribuições.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Química e ao Laboratório de Síntese de Agroquímicos (LASA) por me permitirem realizar este projeto.

A todos os meus colegas de laboratório do LASA, André, João, Renan, Tássia, Adriel, Lucas, Luísa, Luís e Shafiu, por todo companheirismo e aprendizado. Em especial minha mãe emprestada Kamylla por todo apoio, ensinamento e cuidado durante esses dois anos e minha amiga Stephani por dividir as lutas diárias e as alegrias desse trajeto.

As minhas amigas de república, Mariana, Rafa, Sofia e Carol, por serem lar e amparo. Aos meus amigos, minha segunda família em viçosa, que tornaram todo esse processo mais leve, meu muito obrigada, Bia, Lele, Igor, Mariangela, Roberta, Vitória, Lucas, Galdino, Murilo, Alemão, Luis e Lorenzo.

A todos os professores do curso de química que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Química.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“O conhecimento nos faz responsáveis.”
(Che Guevara)*

RESUMO

FIGUEIREDO, Tainá Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **PERFIL METABOLÔMICO DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALÁRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA.** Orientador: Elson Santiago de Alvarenga.

Plantas do gênero *Crotalaria* possuem um crescimento rápido e se adaptam bem ao clima tropical, sendo de fácil cultivo. São úteis para o controle de insetos, larvas e nematoides, além do uso como adubo verde no sistema de rotação de culturas. Tais habilidades estão ligadas aos metabólitos especializados produzidos por essas plantas. O presente trabalho teve como objetivo o estudo do perfil metabolômico de sementes de diferentes espécies do gênero *Crotalaria*, e a avaliação da atividade herbicida de seus respectivos extratos. A investigação foi motivada pela necessidade de desenvolver defensivos agrícolas mais eficientes e sustentáveis, em um contexto que valoriza a prospecção de compostos bioativos a partir da biodiversidade brasileira. Para isso, foram preparados extratos etanólicos e de solução aquosa ácida a partir das sementes das espécies *Crotalaria ochroleuca*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria breviflora* e *Crotalaria spectabilis*. A caracterização química foi conduzida por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UPLC-QTOF-MSE), e os dados foram submetidos a análises estatísticas multivariadas usando o modelo OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis). A avaliação biológica consistiu em bioensaios de germinação para determinar o efeito dos extratos sobre o crescimento de diferentes plantas. Os resultados da análise metabolômica evidenciaram perfis químicos distintos entre as espécies, com predomínio do alcaloide monocrotalina em *C. spectabilis* e de globiferina em *C. juncea*. Nos bioensaios, todos os extratos exibiram notável atividade herbicida, com inibição acentuada do desenvolvimento do sistema radicular das plântulas. A monocrotalina, um alcaloide pirrolizidínico, demonstrou eficácia inibitória superior à do flavonoide quercetina, corroborando o potencial fitotóxico desta classe de metabólitos especializados. Adicionalmente, não foi observada seletividade pronunciada entre as espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas, o que sugere um amplo espectro de ação para os extratos avaliados. Portanto, os extratos de sementes de *Crotalaria* constituem uma fonte promissora de compostos bioativos com potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas de origem natural, caracterizados por um amplo espectro de ação e um impacto expressivo sobre o sistema radicular das plantas.

Palavras-chave: metaboloma; alcaloides pirrolizidínicos; monocrotalina; produtos naturais

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Tainá Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **METABOLOMIC PROFILE OF SEEDS OF DIFFERENT SPECIES OF SUNFLOWER AND EVALUATION OF HERBICIDAL ACTIVITY.** Adviser: Elson Santiago de Alvarenga.

Plants of the *Crotalaria* genus exhibit rapid growth and adapt well to tropical climates, making them easy to cultivate. They are useful in controlling insects, larvae, and nematodes, in addition to being employed as green manure in crop rotation systems. These abilities are associated with the secondary metabolites produced by these plants. The present study aimed to investigate the metabolomic profile of seeds from different species of the *Crotalaria* genus, as well as to evaluate the herbicidal activity of their respective extracts. The research was motivated by the need to develop more efficient and sustainable agricultural pesticides, in a context that values the bioprospecting of bioactive compounds from Brazilian biodiversity. To this end, ethanolic and acidic aqueous solution extracts were prepared from the seeds of *Crotalaria ochroleuca*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria breviflora* and *Crotalaria spectabilis*. Chemical characterization was conducted using Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with High-Resolution Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MSE), and the data were subjected to multivariate statistical analyses, using the OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) model. The biological evaluation consisted of germination bioassays to determine the effect of the extracts on the growth of different plants. The metabolomic analysis results revealed distinct chemical profiles among the species, with a predominance of the alkaloid monocrotaline in *C. spectabilis* and globiferin in *C. juncea*. In the bioassays, all extracts exhibited notable herbicidal activity, with marked inhibition of seedling root system development. Monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid, demonstrated greater inhibitory efficacy than the flavonoid quercetin, corroborating the phytotoxic potential of this class of secondary metabolites. Additionally, no marked selectivity was observed between monocotyledonous and dicotyledonous species, suggesting a broad spectrum of action for the evaluated extracts. Therefore, *Crotalaria* seed extracts represent a promising source of bioactive compounds with potential for the development of new natural herbicides, characterized by a broad spectrum of action and significant impact on plant root systems.

Keywords: metabolome; pyrrolizidine alkaloids; monocrotaline; natural products

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de <i>Crotalaria ochroleuca</i>	18
Figura 2. Estrutura básica de uma necina	20
Figura 3. Estruturas das bases retronecina, otonecina e platinecina.....	20
Figura 4. Fórmula estrutural da monocrotalina	22
Figura 5. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato etanólico bruto da <i>Crotalaria ochroleuca</i> em UPLC-QTOF-MSE.....	36
Figura 6. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato aquoso com adição de ácido bruto da <i>Crotalaria ochroleuca</i> em UPLC-QTOF-MSE.....	36
Figura 7. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato etanólico bruto da <i>Crotalaria spectabilis</i> em UPLC-QTOF-MSE.....	36
Figura 8. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato etanólico bruto da <i>Crotalaria juncea</i> em UPLC-QTOF-MSE	37
Figura 9. Análise OPLS-DA dos perfis metabólicos de <i>Crotalaria spectabilis</i> e <i>Crotalaria juncea</i> por UPLC-HRMS, evidenciando clara separação entre as espécies.....	39
Figura 10. Análise OPLS-DA dos perfis metabólicos de <i>Crotalaria ochroleuca</i> por UPLC-HRMS extraída em álcool e com solução aquosa ácida (água:HCl, 95:5).....	40
Figura 11. Estrutura da Monocrotalina e da Quercetina, respectivamente.....	48
Figura 12. Plântulas de sorgo obtidas para o extrato T5 na concentração 150 ppm	50
Figura 13. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold	53
Figura 14. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold	55
Figura 15. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold.....	57
Figura 16. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold	59
Figura 17. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold	61
Figura 18. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold	63
Figura 19. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold	66
Figura 20. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold	68
Figura 21. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold	70
Figura 22. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anotação de picos dos compostos químicos presentes em sementes de diferentes espécies de <i>Crotalaria</i>	30
Tabela 2. Compostos químicos presentes no extrato etanólico das sementes de <i>Crotalaria ochroleuca</i>	41
Tabela 3. Compostos químicos presentes no extrato aquoso ácido das sementes de <i>Crotalaria ochroleuca</i>	42
Tabela 4. Informações complementares das sementes	47
Tabela 5. Identificação e massas utilizadas para o preparo das soluções estoque de 1000 ppm dos extratos testados	49
Tabela 6. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold	52
Tabela 7. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de pepino.....	53
Tabela 8. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold	54
Tabela 9. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de pepino	55
Tabela 10. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold	56
Tabela 11. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de tomate	57
Tabela 12. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold	58
Tabela 13. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de tomate.....	59
Tabela 14. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold	60
Tabela 15. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de sorgo	61
Tabela 16. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold	62
Tabela 17. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de sorgo.....	63
Tabela 18. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold	64
Tabela 19. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de braquiária	65
Tabela 20. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold	66
Tabela 21. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de braquiária	67

Tabela 22. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold	69
Tabela 23. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de picão	70
Tabela 24. Efeito dos extratos das sementes de <i>Crotalaria</i> (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold	71
Tabela 25. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de picão	72

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AP: Alcaloides Pirrolizidínicos.

B.O.D.: Incubadora de Demanda Biológica de Oxigênio.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ESI: Ionização por Eletrospray.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

LC-MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.

MIP: Manejo Integrado de Pragas.

MSI: Iniciativa de Padrões em Metabolômica (Metabolomics Standards Initiative).

ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.

OPLS-DA: Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes.

ppm: Partes Por Milhão.

SAR: Relações Estrutura-Atividade.

UPLC-QTOF-MSE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Quadrupolo e Tempo de Voo com Energia de Colisão Elevada.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	12
INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO 1	16
1.1 Introdução	17
1.1.1 O Gênero <i>Crotalaria</i>	17
1.1.2 Alcaloides	19
1.1.3 Alcaloides pirrolizidínicos.....	20
1.1.4 Monocrotalina.....	22
1.1.5 Metaboloma	23
1.1.6 Técnica avançada UPLC-QTOF-MSE	24
1.2 Justificativa e Objetivos	25
1.3 Metodologia	26
1.3.1 Material vegetal	26
1.3.2 Obtenção do extrato etanólico das sementes de <i>Crotalaria</i>	26
1.3.3 Análise por UPLC-QTOF-MSE	27
1.4 Resultados e discussão	28
1.4.1 Cromatogramas de diferentes espécies de <i>crotalaria</i>	28
1.4.2 Análise estatística comparativa da <i>Crotalaria juncea</i> com a <i>Crotalaria spectabilis</i>	37
1.4.3 Análise estatística comparativa de duas diferentes extrações da <i>Crotalaria</i> <i>ochroleuca</i>	40
1.5 conclusão	43
CAPÍTULO 2	44
2.1 Introdução	45
2.2 Materiais e métodos	46
2.2.1 Preparo das soluções.....	47
2.2.2 preparo do bioensaio com sementes	49
2.3 Resultados e discussão	51
2.3.1 avaliação da atividade dos extratos (1-9) e das substâncias Monocrotalina e quercetina sobre o crescimento das plântulas de pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	51
2.3.2 avaliação da atividade dos extratos (1-9) e das substâncias Monocrotalina e quercetina sobre o crescimento das plântulas de tomate (<i>Solanum lycopersicum L.</i>).....	56
2.3.3 avaliação da atividade dos extratos (1-9) e das substâncias Monocrotalina e quercetina sobre o crescimento das plântulas de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	60
2.3.4 avaliação da atividade dos extratos (1-9) e das substâncias monocrotalina e quercetina sobre o crescimento das plântulas de braquiária (<i>Urochloa brizantha</i>)	64
2.3.5 avaliação da atividade dos extratos (1-9) e das substâncias Monocrotalina e quercetina sobre o crescimento das plântulas de picão (<i>Bidens pilosa L.</i>).....	68
2.4 conclusão	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma grande oferta de terra arável e recursos hídricos abundantes, além de um clima adequado ao desenvolvimento agrícola presente em quase todo o território do país, o que favorece o desenvolvimento do agronegócio. No entanto, seu bom desempenho não está relacionado apenas à disponibilidade de recursos naturais, mas também ao uso de tecnologia e manejo, como o uso de defensivos agrícolas, que auxiliam no controle de pragas e doenças que afetam a agricultura (FAROOQ *et al.*, 2024).

Ao longo das décadas, a agricultura brasileira passou por profundas mudanças tecnológicas impulsionadas por diferentes desafios e melhoras na tecnologia. Nas décadas de 1960 e 1970, o foco estava em insumos agrícolas, como fertilizantes, pesticidas e sementes melhoradas. Nas décadas seguintes, surgiram demandas mais complexas, como gestão do agronegócio, preocupações ambientais e exigências dos consumidores, o que impulsionou inovações mais sustentáveis (SAMPAIO *et al.*, 2023).

O uso de herbicidas tem sido a técnica mais utilizada para o controle de plantas daninhas já que sua maioria acarreta um menor custo sem perda de eficiência. Por isso, nos últimos anos, a indústria agroquímica tem investido no desenvolvimento de herbicidas mais eficientes, específicos e com menor agressividade ao meio ambiente. Esse movimento tem contribuído para a valorização e o avanço da química de produtos naturais no Brasil, que vem ganhando destaque e se desenvolvendo de forma significativa no século XXI (BORGES *et al.*, 2017).

O Brasil possui um setor produtivo amplo e estruturado voltado para produtos naturais, com destaque para os segmentos de alimentos, medicamentos e cosméticos. Para garantir sua sustentabilidade e aumentar sua competitividade, é essencial investir em inovação (CAMARGO *et al.*, 2021). Essa área, uma das mais antigas da química orgânica, tem se fortalecido com o avanço de novas ferramentas da biologia molecular, que permitem explorar com mais profundidade o metabolismo secundário dos organismos, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos compostos e aplicações (BORGES *et al.*, 2017).

Os metabólitos especializados são compostos químicos produzidos pelas plantas que desempenham um papel importante na sua interação com o ambiente. Esses compostos têm grande potencial de uso nas áreas farmacêutica e industrial. Estudar os metabólitos especializados é essencial para compreender melhor a biologia vegetal, seus mecanismos de adaptação ao ambiente e suas possíveis aplicações em diversos setores econômicos, principalmente na farmacologia e na agricultura (MORAIS; VIEIRA, 2021).

Além de tudo que foi discutido, o Brasil ocupa uma posição privilegiada nesse campo por abrigar uma das maiores biodiversidades do planeta, o que amplia as possibilidades de descobertas. Nesse cenário, o estudo e a busca de novos compostos com potencial terapêutico, agrícola ou biotecnológico ganham importância estratégica, justificando os investimentos em pesquisas científicas voltadas à valorização e ao aproveitamento sustentável dos recursos naturais (BORGES *et al.*, 2017)

Na busca por novos compostos para o controle químico de plantas daninhas, os produtos naturais vêm se destacando como uma fonte altamente promissora. Diversas classes de substâncias de origem natural têm apresentado atividades reguladoras de crescimento, incluindo compostos encontrados em plantas do gênero *Crotalaria*.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DO METABOLOMA DE SEMENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALARIA

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 O GÊNERO CROTALARIA

O controle de ervas daninhas na agricultura é crucial para alcançar a produtividade desejada, uma vez que essas plantas competem com as culturas por luz, nutrientes e água. Atualmente, a principal estratégia para o controle dessas pragas é o uso de herbicidas sintéticos, cuja aplicação pode resultar em diversos problemas ambientais e sociais, além de implicar altos custos financeiros (CARVALHO et al., 2024).

Diante desses desafios, há uma crescente demanda por métodos alternativos de controle de pragas. Entre esses métodos, destaca-se a utilização de plantas com potencial alelopático, que se refere à capacidade de uma planta de estimular ou inibir o desenvolvimento de outras espécies vegetais ao seu redor. A *Crotalaria* é um exemplo notável desse tipo de planta, com potencial para contribuir na gestão de ervas daninhas em sistemas agrícolas (HOLANDA et al., 2024).

As *Crotalarias*, pertencentes à família Fabaceae, são um grupo de plantas amplamente distribuídas globalmente, com cerca de 600 espécies identificadas, principalmente no México, Brasil, Índia e África. Essas plantas adaptam-se bem a climas tropicais e subtropicais (SOTO-ESTRADA; CRUZ-DURÁN, 2023).

As espécies do gênero *Crotalaria* apresentam notável adaptabilidade a solos arenosos e de baixa fertilidade, o que pode resultar em incrementos significativos na produtividade das culturas subsequentes (RECH et al., 2024). Tratando-se de leguminosas, essas plantas possuem um crescimento acelerado. Suas folhas são simples e alternadas e as flores, geralmente amarelas, apresentam um cálice maior que a corola. As vagens são cilíndricas e se propagam por meio de sementes, que exibem variações na coloração do tegumento (ANDRADE et al., 2007)(Figura 1).



Figura 1. Plantas de *Crotalaria ochroleuca*

As espécies do gênero *Crotalaria* apresentam diversas aplicações na agricultura, além de propriedades terapêuticas significativas, como atividade anticancerígena, anti-inflamatória e hepatotóxica, o que tem atraído o interesse de múltiplos grupos de pesquisa (XIA *et al.*, 2020). Especificamente, algumas espécies demonstram potencial como agentes anticancerígenos, especialmente em relação ao câncer de mama e colo do útero, oferecendo assim uma alternativa natural para o tratamento dessas neoplasias (PRABHAKAR *et al.*, 2024).

Muitos estudos recentes direcionados a essas plantas comprovam sua aplicabilidade na agricultura como o uso da *Crotalaria juncea* para melhorar a disponibilidade de nutrientes no solo, favorecendo a produção de compostos bioativos relevantes para as plantas medicinais como a *Lippia dulcis* (SALOMON *et al.*, 2025). Além disso, o uso da *Crotalaria spectabilis* é recomendado como uma estratégia eficaz para controlar o nematoide *Pratylenchus brachyurus* em plantas de soja e outras culturas, contribuindo para a redução de infestações e perdas agrícolas (CARVALHO *et al.*, 2025).

O gênero *Crotalaria* é caracterizado por uma ampla diversidade de espécies, entre as quais se destacam *C. retusa*, *C. ochroleuca*, *C. juncea*, *C. breviflora* e *C. spectabilis*, que serão objeto deste estudo. Todas as espécies de *Crotalaria* têm a capacidade de sintetizar o alcaloide pirrolizidínico conhecido como monocrotalina, além de outros compostos que ainda estão sob investigação. Registros apontam o uso de *C. spectabilis* e *C. juncea* por pequenas comunidades na América do Sul e na Índia no tratamento de diversas doenças de pele, como sarna e psoríase (MAREGESI *et al.*, 2007). Recentemente, a espécie *C. heteromorpha* foi identificada, adicionando-se assim à vasta lista de espécies do gênero (SOTO-ESTRADA; CRUZ-DURÁN, 2023).

As *Crotalarias* têm sido amplamente utilizadas na agricultura como adubo verde, contribuindo para a melhoria das condições do solo e para o controle da erosão. Além disso,

essas plantas reduzem as populações de nematoides, inibem o crescimento de insetos e larvas, e limitam a proliferação de plantas daninhas. Essas atividades biológicas estão diretamente relacionadas à sua composição química, incluindo a presença de alcaloides pirrolizidínicos (AP) (OLIVEIRA et al., 2018). A predominância de nitrogênio em sua forma livre resulta em incrementos significativos na biomassa (CHAGAS et al., 2024).

A toxicidade das espécies de *Crotalaria* é atribuída à presença de alcaloides pirrolizidínicos (GAO et al., 2020). A toxicidade, em sua maioria carcinogênica, afeta tanto animais quanto humanos e resulta da ingestão da planta, seguida pela absorção intestinal de suas moléculas. Essas substâncias são metabolicamente ativadas no fígado, onde podem reagir com macromoléculas celulares, iniciando assim a ação tóxica aguda ou crônica e provocando efeitos mutagênicos em mamíferos (KEMPF et al., 2010). No Brasil, há diversos relatos de intoxicação em animais decorrente da ingestão dessas plantas, especialmente em contextos de escassez alimentar, onde a *Crotalaria* se torna uma espécie invasora predominante nos pastos (QUEIROZ et al., 2013).

1.1.2 ALCALOIDES

As plantas do gênero *Crotalaria* sintetizam uma ampla gama de compostos biologicamente ativos, incluindo alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas, os quais demonstram propriedades antitumorais. Os flavonoides presentes nessas espécies exibem atividade alelopática, enquanto os alcaloides são responsáveis por intoxicações em animais que se alimentam delas (KUSAR et al., 2024).

Muitas drogas e medicamentos derivados de alcaloides têm origem vegetal, por exemplo, a morfina, a quinina, a cafeína e a nicotina (MORAIS; VIEIRA, 2021). Os alcaloides são substâncias nitrogenadas de origem natural, caracterizadas pela presença de um nitrogênio em estrutura heterocíclica e possuem ação farmacológica. Uma característica comum desses compostos é o seu comportamento como uma base (CHEN et al., 2024).

Os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes das plantas, podendo acumular-se em quantidades variáveis em órgãos específicos, e desempenham diversas funções, sendo a mais comum a atuação no sistema de defesa das plantas. Devido à sua composição, esses compostos constituem alternativas viáveis para a recuperação de terras degradadas e para a melhoria do acúmulo de nutrientes no solo, uma vez que apresentam alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio (CARVALHO et al., 2024).

1.1.3 ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Estima-se que mais de 660 tipos de alcalóides pirrolizidínicos estejam presentes em mais de 6.000 plantas de espécies das famílias Asteraceae, Apocynaceae, Fabaceae e Boraginaceae. A maioria dos AP existe em duas formas, incluindo aminas terciárias ou N-óxidos. Os diferentes tipos são formados a partir de combinações de diferentes anéis pirrólicos duplos fundidos (CHEN *et al.*, 2024).

Alcaloides pirrolizidínicos são bislactonas (ésteres de aminoálcoois com um núcleo de base necina (Figura 2) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos). As necinas caracterizam-se por apresentar um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como "cabeça de ponte", um grupamento hidroximetila em C1 e uma hidroxila em C7 (MEDEIROS ET AL., 2006).

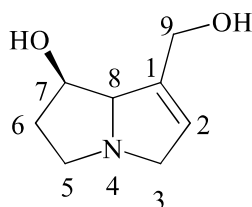


Figura 2. Estrutura básica de uma necina

A união entre um núcleo pirrolidina (base necina) e ácidos alifáticos pode resultar na formação de monoésteres e diésteres de três tipos: retronecina, otonecina e platinecina respectivamente (SHI *et al.*, 2018), (Figura 3). A base necina difere no grau de hidroxilação, estereoquímica, substituintes e no grau de insaturação do anel (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

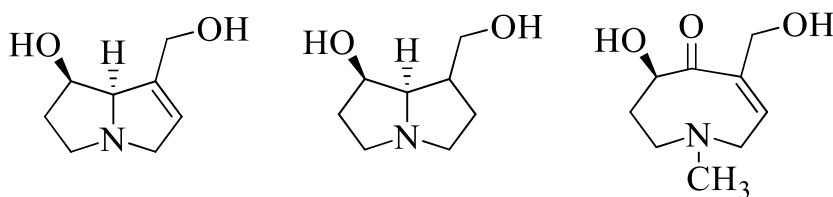


Figura 3. Estruturas das bases retronecina, otonecina e platinecina

A toxicidade dos AP depende principalmente da natureza da ligação na posição 1,2 do sistema de anel da pirrolidina. Para exercer toxicidade, pelo menos um grupo hidroxila deve ser esterificado com um ácido ramificado. A toxicidade induzida pelo alcaloide pirrolizidínico está intimamente relacionada ao processo metabólico da planta (CHEN *et al.*, 2024).

Os alcaloides pirrolizidínicos geralmente são encontrados em plantas, mas também já foram isolados e identificados em animais. No caso de animais selvagens, os alcaloides

pirrolizidínicos foram isolados principalmente de sapos e insetos e presume-se que esses animais não sintetizam esses compostos e sim os consomem e armazenam através da sua dieta vegetal, que posteriormente utilizam como defesa contra os seus predadores (SCOTT CHIALVO et al., 2018; WINK, 2019).

À medida que as moléculas foram isoladas e caracterizadas no gênero *Crotalaria*, suas propriedades farmacológicas foram sendo investigadas, assim como uma grande diversidade de funções e suas possíveis aplicações foram reportadas. Dentre estas, a modulação da resposta imune, seu poder antioxidante, efeitos microbicidas e como inibidores da digestão e do crescimento de insetos e larvas (MAREGESI *et al.*, 2007).

Os alcalóides pirrolizidínicos pertencem a uma classe de metabólitos especializados, eles são responsáveis pela proteção contra patógenos e pragas nas plantas na qual estão presentes. (CHEN *et al.*, 2024). Adicionalmente, os alcaloides pirrolizidínicos demonstraram expressivos efeitos nematicidas e repelentes de diferentes parasitas de plantas e nematoides, contudo, os efeitos foram mais pronunciados para os alcaloides pirrolizidínicos terciários do que para os oxidados, representando assim importantes candidatos para novas estratégias de manejo contra os nematoides de solo (SUBAEDAH; ALADIN; NIRWANA, 2016).

Os alcaloides pirrolizidínicos potencialmente tóxicos exibem características essenciais em sua estrutura, como: 1) um anel do pirrolizidínico insaturado; 2) um ou dois grupos hidroxila ligados ao anel; 3) um ou dois grupamentos ésteres e 4) a molécula de ácido ramificada. Apesar da sua rica diversidade todos compartilham uma estrutura em comum: são alcaloides compostos por necina esterificada com um ou mais ácidos nécicos (PACHECO, 2010). Essa toxicidade pode levar a vários efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos já relatados ao longo da história (GAO et al., 2020; HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010; SCHRAMM et al., 2019; SCHRENK, 2020).

Alguns insetos desenvolveram estratégias para utilizar esses aleloquímicos em sua própria defesa contra predadores. Um exemplo notável dessa adaptação são as borboletas neotropicais da subfamília Ithomiinae, que absorvem AP exclusivamente através do néctar das flores ou de galhos secos, o que as protege de predadores como a aranha *Nephila clavipes* (CHEN *et al.*, 2024).

As diversas estruturas apresentadas pelos alcaloides estão diretamente relacionadas com a sua toxidez. A retronicina e a otonecina, por exemplo, apresentam ligação dupla nas posições 1 e 2 da base necina, o que confere alta toxicidade, dentre elas hepatotóxicas, genotóxicas e pneumotóxicas (GAO et al., 2020; HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2018; SCHRAMM; KÖHLER; ROZHON, 2019). Já a platinecina não contém instauração na base

necina, tornando-a de baixa ou nenhuma toxicidade (SHI *et al.*, 2018). Segundo análise de dados apresentados na literatura, a exposição de seres humanos aos alcaloides pirrolizidínicos não gera o câncer (PRAKASH *et al.*, 1999).

1.1.4 MONOCROTALINA

As espécies do gênero *Crotalaria* são reconhecidas por sua composição que inclui aminoácidos não proteicos e alcaloides pirrolizidínicos, além disso, a *Crotalaria* produz o alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (Figura 4) que se destaca como o principal componente (RECH *et al.*, 2024).

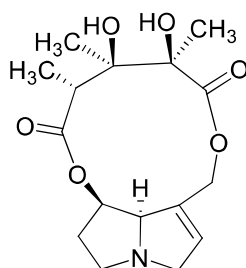


Figura 4. Fórmula estrutural da monocrotalina

Geralmente, as espécies de *Crotalaria* são reconhecidas pela alta produção de monocrotalina, embora outros alcaloides pirrolizidínicos possam estar presentes em quantidades menores. Em algumas espécies de *Crotalaria*, a monocrotalina pode compor até 5% do peso seco das sementes. A estrutura deste composto consiste em uma base nitrogenada retronecina ligada ao ácido monocrotálico (RECH *et al.*, 2024).

A monocrotalina é uma substância altamente tóxica para vertebrados, incluindo bovinos, suínos, ovinos, equídeos, entre outros, sendo documentados casos de intoxicação no Brasil. No Estado da Paraíba, observaram-se sinais clínicos em cavalos, como encefalopatia hepática, comportamento locomotor compulsivo e descontrolado, além de perda de peso. A análise da área de intoxicação revelou uma presença significativa de *C. retusa*, cujo consumo foi associado à intoxicação dos animais. Esses achados evidenciam claramente os efeitos adversos provocados por essa planta específica na saúde dos equinos na região estudada. (MEDEIROS *et al.*, 2004).

A produção de monocrotalina pode ser influenciada por diversos fatores, como a disponibilidade de água, a nutrição das plantas e a incidência de pragas e/ou doenças. Sabe-se que a decomposição da massa seca da *Crotalaria* pode liberar monocrotalina e outros compostos para o solo, os quais podem interferir nas pragas presentes (RECH *et al.*, 2024a). Sabendo da alta toxicidade da monocrotalina e de seus efeitos indesejados vem se buscando métodos

alternativos para minimizar a ação deste composto, utilizando produtos naturais como flavonoides e cumarinas (SHI *et al.*, 2018).

A monocrotalina foi o primeiro alcaloide a ser isolado do gênero *Crotalaria* (SCHRENK, 2020). Devido a sua ação tóxica a monocrotalina traz um grande interesse de estudiosos a fim de avaliar melhor e minimizar os efeitos.

1.1.5 METABOLOMA

Nos últimos anos, observou-se um crescente interesse na exploração de diversas fontes de biomoléculas, como plantas, micro-organismos, insetos e outros organismos. Sendo a busca por moléculas bioativas com potencial farmacêutico e agrônômico um dos principais focos de pesquisa (BORGES *et al.*, 2017).

A bioeconomia surge como uma alternativa estratégica para promover o desenvolvimento sustentável e estimular o crescimento econômico de forma verde, em consonância com as metas da Agenda 2030 e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (CAMARGO *et al.*, 2021). O avanço das ciências ômicas, como metabolômica, proteômica e metagenômica, ampliou significativamente as possibilidades de investigação, permitindo uma compreensão mais ampla e detalhada do metabolismo secundário (BORGES *et al.*, 2017).

Metabólitos especializados são compostos químicos produzidos pelas plantas (e por outros organismos vivos) que não estão diretamente envolvidos nos processos essenciais de crescimento, desenvolvimento e reprodução, que são considerados metabólitos primários (PILON *et al.*, 2020). Eles desempenham funções essenciais na sua defesa, comunicação e adaptação ao ambiente e funções específicas como a defesa contra ataques de patógenos, proteção contra radiação UV, atração de polinizadores e adaptação ao ambiente (MORAIS; VIEIRA, 2021).

Apesar de não serem essenciais para a sobrevivência imediata, esses metabólitos, possuem atividades farmacológicas diversas, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anticancerígena, entre outras, sendo utilizados na fabricação de medicamentos e na indústria agrícola. O conhecimento aprofundado dessas classes químicas possibilita a prospecção de novos compostos bioativos e o desenvolvimento de produtos a partir de fontes naturais (MORAIS; VIEIRA, 2021).

O metaboloma é particularmente complexo devido à enorme diversidade estrutural dos metabólitos e variações na quantidade, além das dificuldades associadas à sua análise e identificação, é um grupo de compostos altamente dinâmico e variado (MATOS *et al.*, 2023).

O metaboloma refere-se ao conjunto completo de metabólitos presentes em um organismo, tecido, célula ou sistema biológico em um dado momento. Os metabólitos são pequenas moléculas envolvidas no metabolismo, incluindo tantos metabólitos primários, que são essenciais para funções básicas como crescimento, energia e compostos estruturais, quanto metabólitos especializados, que frequentemente participam de processos de interação com o ambiente, defesa, comunicação e adaptação (PILON *et al.*, 2020).

A metabolômica se apresenta como uma ferramenta essencial para a compreensão abrangente do funcionamento dos organismos vegetais. Essa abordagem envolve estratégias metodológicas específicas, além de enfrentar desafios relacionados à complexidade e diversidade dos metabólitos. Sendo assim, é notória a necessidade de integrar estudos computacionais com experimentos biológicos para validar resultados e promover avanços científicos sustentáveis nessa área (MATOS *et al.*, 2023).

Os métodos utilizados são apoiados por softwares especializados, capazes de processar e interpretar dados multidimensionais, possibilitando a identificação e quantificação precisa dos metabólitos presentes nas amostras vegetais (MATOS *et al.*, 2023).

O estudo do metaboloma é fundamental para entender os processos bioquímicos que sustentam a vida e as interações entre os organismos e seu ambiente. Embora a metabolômica de plantas tenha avançado significativamente com o desenvolvimento de tecnologias, a cobertura total do material vegetal ainda é um grande desafio devido à vastidão e complexidade desses perfis metabólicos (MATOS *et al.*, 2023). O avanço dessa área no país é bastante promissor por se beneficiar da biodiversidade brasileira, com um movimento crescente de projetos em diversas áreas relacionadas à pesquisa de produtos naturais (BORGES *et al.*, 2017).

1.1.6 TÉCNICA AVANÇADA UPLC-QTOF-MSE

A caracterização química de extratos vegetais e outras matrizes biológicas é um grande desafio devido a sua enorme diversidade estrutural (MATOS *et al.*, 2023). Para superar essa complexidade, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução emergiu como uma plataforma robusta e essencial. Essa combinação possibilita a separação e a identificação simultânea de um grande número de compostos em uma única análise, oferecendo uma visão abrangente do perfil químico (LEI *et al.*, 2023).

A principal vantagem da UPLC em relação à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) está no uso de colunas recheadas com partículas de diâmetro reduzido que operam sob pressões elevadas. Essa configuração resulta em ganhos expressivos de eficiência, resolução e sensibilidade, permitindo a distinção precisa de compostos estruturalmente

semelhantes. Além disso, a maior velocidade de análise otimiza o processamento de amostras em escala laboratorial, reduzindo o tempo de execução sem comprometer a qualidade dos resultados (SUN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2012).

Associado à UPLC, o espectrômetro de massas híbrido QTOF acrescenta a precisão necessária para uma identificação confiável. A capacidade do analisador TOF de medir massas exatas com alta resolução possibilita a determinação sem grandes erros de fórmulas moleculares aumentando a confiabilidade do método (SUN *et al.*, 2019). Uma evolução desta abordagem é o modo de aquisição MSE, no qual a energia de colisão alterna entre baixa e alta durante a análise. Esse procedimento garante a aquisição simultânea de íons precursores e fragmentos, proporcionando um registro digital completo do perfil químico da amostra e minimizando a perda de informações (YANG *et al.*, 2020).

A interpretação dos grandes volumes de dados produzidos por UPLC-QTOF-MSE exige a aplicação de ferramentas quimiométricas avançadas. Entre elas, destacam-se as análises multivariadas, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes (OPLS-DA) (ZHANG *et al.*, 2012). A confiabilidade de um estudo metabolômico não depende apenas da instrumentação, mas também da adoção de protocolos rigorosos de controle de qualidade. A aquisição de dados em modos de ionização positivo e negativo aumenta a abrangência química do estudo (YANG *et al.*, 2020).

A etapa final de anotação dos compostos integra diferentes parâmetros, como massa exata, perfil isotópico, padrões de fragmentação e comparações com bibliotecas espectrais públicas ou privadas, resultando em identificações de alta confiabilidade (LEI *et al.*, 2023). Assim, a combinação sinérgica de UPLC, espectrometria de massas de alta resolução e métodos quimiométricos oferecem uma plataforma capaz de revelar em profundidade a composição química de matrizes biológicas complexas.

1.2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

No contexto brasileiro, a química de produtos naturais tem avançado de maneira significativa, sendo esses progressos atribuídos à ampla biodiversidade do país e aos esforços de numerosos pesquisadores. A demanda pelo estudo de produtos naturais tem crescido consideravelmente, em virtude de suas diversas aplicações tecnológicas, incluindo a produção de medicamentos, defensivos agrícolas e alimentos, entre outros (BLANK *et al.*, 2023).

O emprego dessas técnicas visa aumentar a produção de biomassa e de metabólitos especializados específicos de interesse, por meio de novos métodos biotecnológicos. Dentre as

investigações realizadas, destacam-se as pesquisas sobre plantas do gênero *Crotalaria*, que produzem uma variedade de compostos com potencial para o combate a diferentes tipos de pragas e doenças.

Além das preocupações relacionadas à intoxicação de animais e ao impacto econômico associado à sua toxicidade, outros fatores são relevantes no estudo das espécies de *Crotalaria*. Essas plantas apresentam propriedades que possibilitam sua utilização como adubo verde, contribuindo para a melhoria da qualidade do solo durante a rotação de culturas. Ademais, são eficazes no controle de pragas, como nematoides, insetos e larvas.

A cultura de *Crotalaria* é amplamente empregada na agricultura devido à sua capacidade de produzir elevada biomassa e facilitar a ciclagem de nutrientes, especialmente do nitrogênio (RECH et al., 2024). Assim, o estudo dessas plantas pode ter um impacto significativo no setor agrícola e econômico, contribuindo para um manejo de pragas de forma mais natural e menos prejudicial.

Portanto, é fundamental realizar mais estudos sobre a concentração de alcaloides e flavonoides nas espécies de *Crotalaria*, bem como a elucidação dos efeitos desses compostos sobre os principais insetos e pragas que afetam as culturas a serem protegidas.

O presente trabalho tem como objetivo identificar metabólitos especializados extraídos de sementes de algumas espécies de *Crotalaria*, utilizando-se da análise por UPLC-QTOF-MSE além de fazer análises estatísticas dos metabolomas comparando seus compostos e atividades. Além disso, foi realizado um teste biológico para análise da atividade herbicida desses extratos e um estudo comparativo entre um alcaloide, a Monocrotalina, e um flavonoide, a Quercetina.

1.3 METODOLOGIA

1.3.1 MATERIAL VEGETAL

As sementes das espécies de *Crotalaria* de alta pureza foram adquiridas da empresa Brseeds Sementes Ltda na safra de 2023. Sendo escolhidas as espécies de *Crotalaria ochroleuca*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria breviflora* e *Crotalaria spectabilis*.

1.3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES DE CROTALARIA

As sementes das espécies de *Crotalaria* (3 kg) foram pesadas individualmente e submetidas a um processo de trituração utilizando um liquidificador industrial. Para que essa trituração ocorresse de forma eficiente as sementes foram submetidas a uma hidratação prévia por imersão em água destilada durante a noite (12 h) para facilitar o processo de maceração.

Posteriormente, foi realizada a extração dos compostos bioativos, riturando as sementes hidratadas utilizando etanol comercial a 96°GL, na proporção de 9L durante um período de cinco dias. A solução etanólica foi agitada diariamente para assegurar a homogeneização e a extração dos compostos. Ao término do período de extração, realizou-se uma filtração simples, obtendo-se um filtrado, que foi então concentrado em um evaporador rotatório. Após esse processo, o líquido, sem as sementes, foi levado para a liofilização para retirar a água presente no extrato, obtendo-se o extrato etanólico bruto.

Além dessa extração, foi realizada outra apenas para as espécies *C. ochroleuca* e *C. breviflora*. O bagaço residual das sementes retiradas do álcool foi submetido a uma nova extração com solução aquosa ácida (água:HCl, 95:5). A solução obtida foi liofilizada, obtendo-se o extrato bruto aquoso.

1.3.3 ANÁLISE POR UPLC-QTOF-MSE

Os extratos foram analisados por UPLC-QTOF-MSE para a anotação de pico.

Os reagentes e solventes utilizados foram a Leucina-encefalina (Waters Technologies, EUA) e quercetina ($\geq 95\%$, grau HPLC; Sigma-Aldrich, EUA) foram utilizadas como padrões de controle de qualidade externo. Ácido fórmico LiChropur™ (98–100%, grau HPLC; Merck, Alemanha), assim como acetonitrila e metanol Chromasolv™ ($\geq 99,9\%$, grau LC-MS; Honeywell, Alemanha), foram empregados como solventes cromatográficos. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q™ (Millipore, EUA).

As análises foram realizadas em um sistema ACQUITY™ UPLC I-Class Plus (Waters Corp., Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Xevo G3 QToF, equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando em modo de íons positivos. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna ACQUITY UPLC HSS T3 ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $1,8 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula), mantida a 40°C . A fase móvel foi composta pelo solvente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e solvente

A fase móvel foi composta pelo solvente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico), entregue a uma vazão de 0,450 mL/min segundo o seguinte programa de gradiente: 0,00–1,00 min, 5% B; 1,00–7,00 min, aumento linear até 70% B; 7,00–8,00 min, rampa até 99% B; 8,00–10,00 min, mantido em 99% B; 10,10–12,00 min, reequilíbrio para 5% B. O volume de injeção foi de 3 μL .

Os dados de espectrometria de massas foram adquiridos em modo MSE, com varreduras alternadas de baixa energia (6 eV) e alta energia (com rampa de 25 a 45 eV). Os dados foram

coletados no modo centroid dentro de uma faixa de m/z 50–1500. Os parâmetros do instrumento incluíram voltagem do capilar de 2,0 kV e voltagem do cone de amostragem de 40 V. A temperatura de dessolvatação foi ajustada para 500 °C, com fluxo de gás de nitrogênio de 800 L/h. O controle do equipamento e a aquisição de dados foram realizados com o software MassLynx, versão 4.1 (Waters Corp.).

O perfil químico das amostras foi realizado com o sistema Waters ACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas QTOF (Waters, Milford, MA, EUA), utilizando a interface de ionização por eletropulverização no modo de ionização positiva (ESI+). O modo ESI+ foi adquirido no intervalo de 110–1180 Da, com a temperatura da fonte fixada em 120 °C, temperatura de dessolvatação em 350 °C, vazão do gás de dessolvatação de 500 L/h, cone de extração ajustado para 0,5 V e tensão capilar de 3,2 kV.

Os dados brutos de metabolômica dos extratos analisados foram processados utilizando o software Progenesis QI™ (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), para desconvolução espectral, alinhamento de características e detecção de picos nos conjuntos de dados MSE. A anotação dos metabólitos foi realizada por meio da correspondência de massa exata, distribuição isotópica e padrões de fragmentação com diversos bancos de dados.

Os dados gerados pelas análises UPLC-QTOF-MSE foram processados no software MassLynx versão 4.2. A comparação de todos os picos no cromatograma de massas foi orientada pelas regras heurísticas propostas por SUMNER *et al.*, (2007), com um limite de precisão de massa de 0,02 Da. As anotações de picos dos metabólitos foram realizadas através de tentativa, segundo a classificação de Nível 2.1 da Metabolomics Standards Initiative (MSI) (SCHRIMPE-RUTLEDGE *et al.*, 2016; SUMNER *et al.*, 2007), e somente aqueles previamente relatados em estudos anteriores foram considerados para interpretação biológica.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 CROMATOGRAMAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CROTALARIA

O perfil químico dos extratos etanólicos de espécies do gênero *Crotalaria* foi determinado por meio da análise dos cromatogramas e espectros de massa obtidos no modo de ionização positiva (ES+). Os resultados foram comparados com dados da literatura sobre metabólitos previamente identificados na mesma família, gênero e espécies.

A técnica de UPLC-QTOF-MSE foi utilizada por combinar alta eficiência na separação cromatográfica com detecção de alta resolução em espectrometria de massas, o que permitiu

uma análise detalhada dos compostos presentes nos extratos das diferentes espécies de *Crotalaria*.

Durante a etapa de anotação de pico, os extratos foram separados cromatograficamente, permitindo distinguir os compostos com base em seus tempos de retenção. Em seguida, os picos obtidos foram analisados por espectrometria de massas, fornecendo informações sobre a massa molecular e os fragmentos característicos de cada substância.

A anotação de pico dos compostos foi feita por comparação dos espectros de fragmentação com bancos de dados públicos e comerciais. Anotação de picos dos compostos se encontram nas tabelas abaixo.

Tabela 1. Anotação de picos dos compostos químicos presentes em sementes de diferentes espécies de Crotalaria

Tempo de retenção (min)	<i>m/z</i>	Descrição	Fórmula	Score	Score de Fragmentação	Erro de Massa (ppm)	Similaridade		Adutos
							Isotópica	Pseudo ion molecular	
0,43	156,10	Retronecina	C ₈ H ₁₃ NO ₂	42,6	14,5	0,25	98,61		M+H
0,49	326,16	Monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	55,6	80,9	-0,05	97,05		M+H
0,54	154,09	Crotanecina	C ₈ H ₁₃ NO ₃	37,8	0	-1,42	90,68		M+H-H ₂ O
0,60	326,16	Monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	51,2	60,2	2,44	98,44		M+H
0,62	370,19	Globiferina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₇	45,4	28,8	0,09	98,31		M+H
0,65	310,17	Cropodina	C ₁₆ H ₂₅ NO ₆	39,4	2,38	1,94	97,01		M+H-H ₂ O
0,65	310,17	Fulvina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	39,1	0,747	2,06	97,26		M+H
0,65	366,19	Senkirkina	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆	42	15,6	0,98	95,44		M+H
0,69	352,18	Anacrotina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	56,2	83,5	-0,15	97,65		M+H
0,69	352,18	Globiferina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₇	56,1	83,1	-0,14	97,39		M+H-H ₂ O
0,69	352,18	Mucronatinina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	56,3	84,2	-0,15	97,65		M+H
0,69	352,18	Retrorsina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	56,3	84,2	-0,15	97,65		M+H
0,72	595,17	Apigenina 7,4'-di-hexosídeo (Isômero I)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	51	61,4	1,36	95,29		M+H-H ₂ O, 2M+H, M+H
0,72	310,16	Cropodina	C ₁₆ H ₂₅ NO ₆	51,4	62,6	-2,32	97,24		M+H-H ₂ O
0,72	310,16	Fulvina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	41,8	14,5	-2,46	97,39		M+H

0,72	457,11	Isovitexina 6"-O-acetil	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	48,3	51,2	-3,17	94,16	M+H-H ₂ O, M+H
0,72	595,17	Vitexina 4'-O-hexosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	51	61,4	1,36	95,29	M+H-H ₂ O, 2M+H, M+H
0,78	138,09	Retronecina	C ₈ H ₁₃ NO ₂	54,8	78,2	1,37	97,33	M+H-H ₂ O
0,80	310,17	Cropodina	C ₁₆ H ₂₅ NO ₆	47,9	57,5	0,59	82,80	M+H-H ₂ O
0,80	310,17	Fulvina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	44,1	38,5	0,63	82,59	M+H
0,92	308,15	Monocrotalina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	39,4	11,1	2,74	89,16	M+H-H ₂ O
0,93	473,11	Isoorientina 6"-O-acetato	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	45,4	39,2	-2,61	90,89	M+H-H ₂ O
0,93	449,11	Isoorientina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	41,8	18,5	1,81	92,76	M+H-H ₂ O, M+H
0,95	193,05	Escopoletina	C ₁₀ H ₈ O ₄	45,6	42	2,61	88,86	M+H
1,01	352,18	Anacrotina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	56,6	88,4	1,76	96,61	M+H
1,01	352,18	Globiferina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₇	56,5	88	1,68	96,36	M+H-H ₂ O
1,01	352,18	Mucronatinina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	56,6	88,5	1,76	96,61	M+H
1,01	352,18	Retrorsina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	56,6	88,5	1,76	96,61	M+H
1,02	671,35	Integerrimina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	51,7	80,8	-0,77	78,87	2M+H
1,05	305,07	Di-hidroquercetina	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	45,6	31,8	-0,15	96,47	M+H
1,06	287,06	2'-Hidroxiqigenistina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	40,7	14,1	2,88	92,93	M+H
1,06	287,06	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	40,7	14,1	2,88	92,93	M+H
1,11	352,18	Anacrotina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	40,9	8,76	0,71	96,46	M+H, 2M+H
1,11	352,18	Mucronatinina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	40,8	8,49	0,71	96,46	M+H, 2M+H
1,11	352,18	Retrorsina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	40,8	8,49	0,71	96,46	M+H, 2M+H
1,12	154,09	Crotanecina	C ₈ H ₁₃ NO ₃	36,5	7,84	2,44	77,60	M+H-H ₂ O

1,12	435,13	Naringenina 7-O-b-D-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	50	56,5	2,77	96,85	M+H-H ₂ O, M+H
1,15	292,15	Fulvina	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	42,9	25	-1,40	91,07	M+H-H ₂ O
1,21	449,11	Isoorientina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	47,3	42,6	2,01	96,49	M+H-H ₂ O, M+H
1,22	433,11	7,2',4'-Tri-hidroxi-isoflavona 4'-O-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	51,7	63,1	1,46	97,07	M+H-H ₂ O, M+H
1,22	433,11	Isovitexina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	51,7	63,1	1,46	97,07	M+H-H ₂ O, M+H
1,22	433,11	Vitexina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	51,7	63,1	1,46	97,07	M+H-H ₂ O, M+H
1,23	597,18	Aromadendrina 7-ramnosil-(1-4)-galactosídeo	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	43,4	29,8	-0,62	87,86	M+H
1,23	323,13	Barbacarpana	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	35,8	4,86	1,41	75,65	M+H
1,23	323,13	Crotina (chalcona)	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	39	21,2	1,34	75,56	M+H-H ₂ O
1,27	465,10	Quercetina-7-O-b-D-glucopiranosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	38,3	1,49	2,01	92,52	M+H
1,36	303,05	Morina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	42,9	23,3	2,75	94,64	M+H
1,40	323,13	Barbacarpana	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	41,3	20,6	2,06	88,15	M+H
1,40	323,13	Crotina (chalcona)	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	42,7	27,8	1,95	88,02	M+H-H ₂ O
1,64	303,05	Morina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	45,7	35,1	2,86	96,74	M+H
1,69	577,16	Apigenina 7,4'-di-hexosídeo (Isômero III)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	44,8	32,6	1,73	93,73	M+H-H ₂ O
1,69	577,16	Vitexina 4'-O-hexosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	44,8	32,6	1,73	93,73	M+H-H ₂ O
1,79	318,17	Integerrimina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	41,1	31,9	3,33	77,51	M+H-H ₂ O
1,89	271,06	Genisteina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	41,5	16,2	3,20	95,22	M+H
2,01	271,06	2'-Hidroxidaidzeína	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	38,2	1,85	3,37	93,29	M+H
2,01	271,06	Genisteina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	40,4	12,7	3,37	93,29	M+H
2,06	172,10	Crotanecina	C ₈ H ₁₃ NO ₃	37,8	3,78	4,64	90,68	M+H

2,30	323,13	Barbacarpana	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	37,1	16,7	2,97	72,29	M+H
2,30	323,13	Crotina (chalcona)	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	42,9	45,3	2,81	72,42	M+H-H ₂ O
2,39	471,35	Ácido Emarginélico	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	41,8	19,4	0,52	90,24	M+H-H ₂ O
3,24	339,12	Crotalarina	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	37,8	5,8	2,57	86,14	M+H
3,24	339,12	Ramosismina	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	38,1	7,73	2,44	85,91	M+H-H ₂ O
3,26	457,37	Ácido Crotálico	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	40,1	5,8	-0,29	94,97	M+H
3,31	273,08	Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	46,9	40,1	2,47	97,21	M+H
3,51	301,07	5,7,4'-Tri-hidroxi-2'-metoxiisoflavona	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	45,9	39,4	3,56	94,42	M+H
3,51	301,07	Isokaempferida	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	48	49,6	3,56	94,42	M+H
3,84	334,16	Anacrotina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	38,6	22,6	-4,24	75,17	M+H-H ₂ O
3,84	334,16	Mucronatinina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	38,5	22,2	-4,24	75,17	M+H-H ₂ O
3,84	334,16	Retrorsina	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	38,5	22,2	-4,24	75,17	M+H-H ₂ O
3,84	334,16	Senecifilina	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	34,3	1,19	-4,47	75,25	M+H
4,17	316,16	Senecifilina	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	39,1	4,73	3,54	95,03	M+H-H ₂ O
4,19	337,11	Crotafurano C	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	39,3	3,84	2,78	96,19	M+H
4,19	337,11	Crotafurano E	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	38,6	0,345	2,64	95,98	M+H-H ₂ O
4,35	339,12	Crotalarina	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	40,1	10,6	2,64	92,89	M+H
4,35	339,12	Ramosismina	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	40,1	11	2,51	92,64	M+H-H ₂ O
6,14	323,13	Barbacarpana	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	38,6	0,0809	3,19	96,76	M+H
6,14	323,13	Crotina (chalcona)	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	38,9	1,58	3,02	96,51	M+H-H ₂ O
6,22	339,12	Crotalarina	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	40,7	14,1	2,39	92,13	M+H

6,22	339,12	Ramosissima	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	40,6	14	2,27	91,89	M+H-H ₂ O
6,50	353,10	Elliptona	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	38	2,03	2,30	90,82	M+H

A análise dos extratos por UPLC-QTOF-MSE permitiu a anotação de um número expressivo de metabólitos especializados, cujos resultados estão compilados na tabela 1 de substâncias identificadas. Nessa tabela consta todas as substâncias encontradas nos 4 cromatogramas abaixo. Os compostos identificados que possuem o nome repetido na tabela correspondem aos isômeros daquele composto que foram eluídos em um tempo de retenção diferente.

Os dados, obtidos com alta precisão de massa (evidenciada pelos baixos valores de erro em ppm), revelam um perfil químico complexo e diverso, dominado por duas classes principais de compostos: alcaloides pirrolizidínicos e flavonoides, o que permitiu compreender com mais profundidade o perfil metabolômico das sementes de *Crotalaria*.

A principal constatação é a confirmação da presença e da vasta diversidade de alcaloides pirrolizidínicos (AP). Foram anotados diversos AP conhecidos para o gênero *Crotalaria*, incluindo Monocrotalina, Retrorsina, Integerrimina, Anacrotina, Mucronatinina, Globiferina e a base necina. A presença e a variação no perfil destes alcaloides entre as diferentes espécies e extratos são fundamentais, pois esta classe de compostos é diretamente responsável pela toxicidade e possivelmente pelas atividades biológicas (nematicida, alelopática, herbicida) atribuídas a estas plantas.

Além dos alcaloides, a análise revelou uma notável abundância e variedade de flavonoides. Foram identificadas múltiplas subclasses, como flavonas (Apigenina, Vitexina), flavonóis (Kaempferol, Morina), isoflavonas (Genisteína) e flavanonas (Naringenina). Ressalta-se também a detecção de diversas formas glicosiladas (conjugadas com açúcares), como a Apigenina 7,4'-di-hexosídeo e a Naringenina 7-O-beta-D-glicosídeo.

Outro ponto de destaque é a detecção de múltiplos isômeros para um mesmo composto, como observado para a anacrotina, a retrorsina e a crotalarina. Essas moléculas possuem a mesma fórmula e massa molecular, mas eluem em tempos de retenção diferentes devido a sutis distinções estruturais. Este achado não apenas confirma a complexidade química dos extratos, mas também valida a alta capacidade de resolução do método cromatográfico empregado, que foi capaz de separar esses compostos estruturalmente semelhantes.

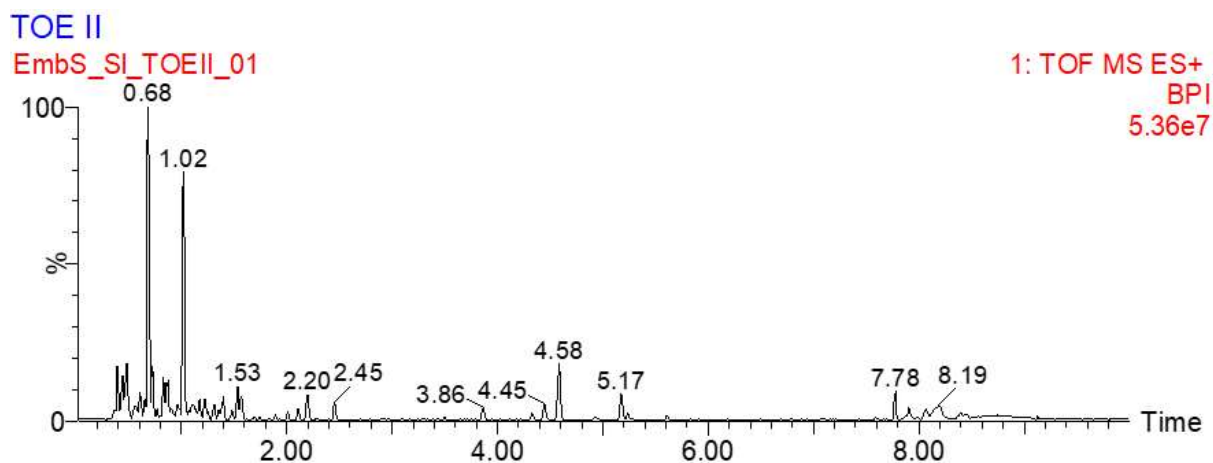


Figura 5. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato etanólico bruto da *Crotalaria ochroleuca* em UPLC-QTOF-MSE

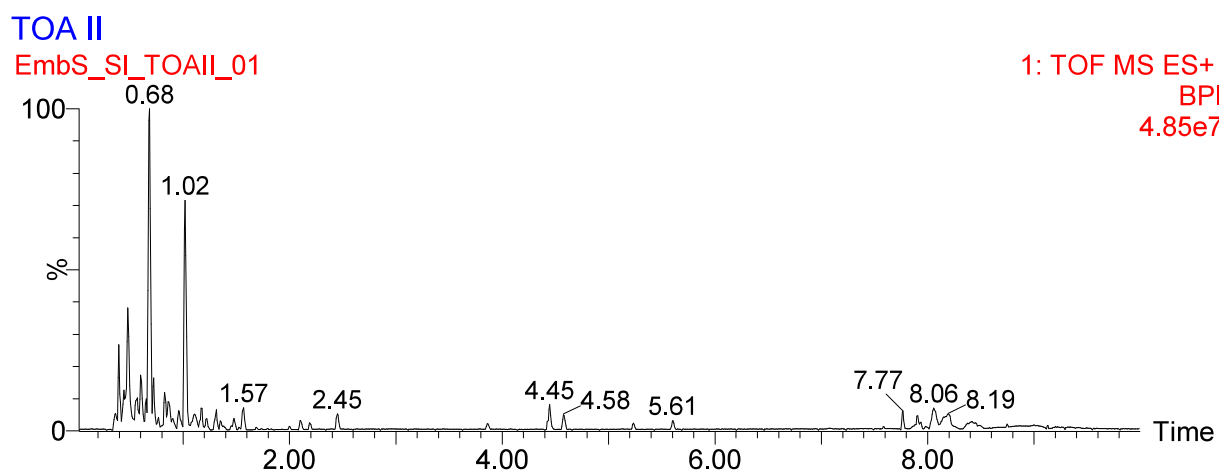


Figura 6. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato aquoso com adição de ácido bruto da *Crotalaria ochroleuca* em UPLC-QTOF-MSE

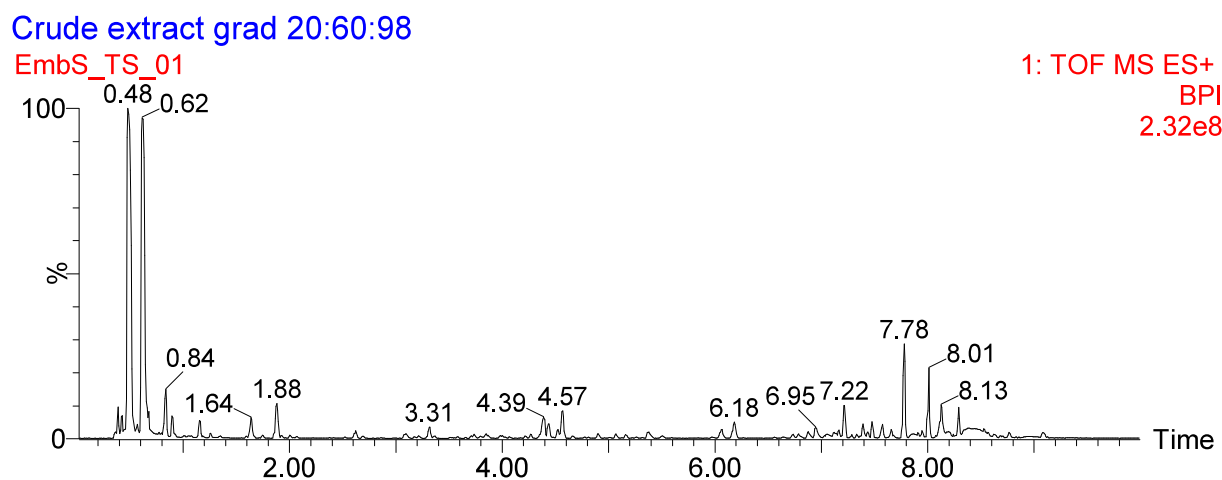


Figura 7. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato etanólico bruto da *Crotalaria spectabilis* em UPLC-QTOF-MSE

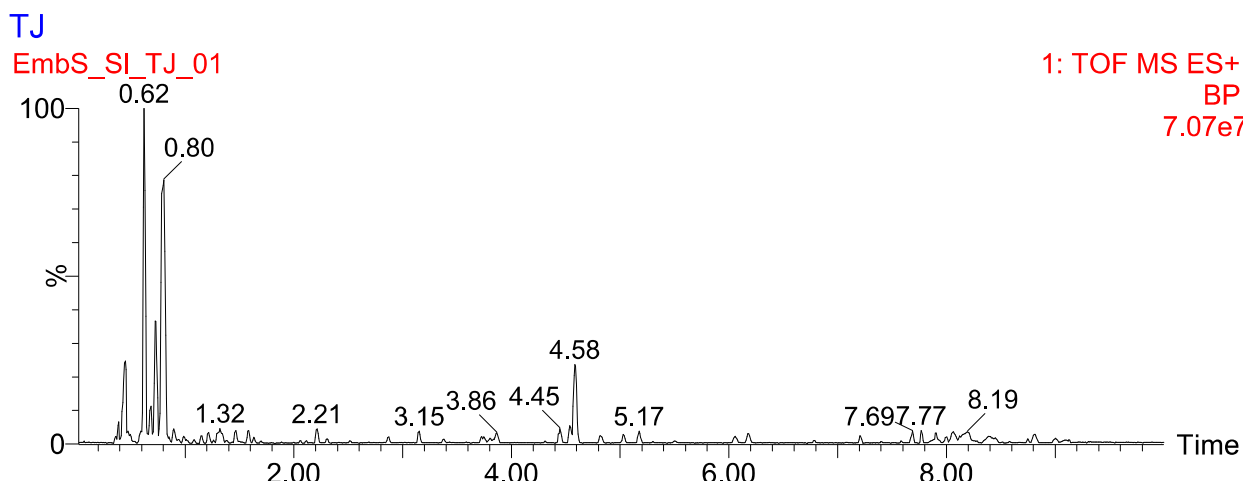


Figura 8. Cromatograma obtido a partir da injeção do extrato etanólico bruto da *Crotalaria juncea* em UPLC-QTOF-MSE

Com base na análise dos cromatogramas obtidos, é possível observar a elevada complexidade química dos extratos vegetais brutos, evidenciada pelo grande número de picos detectados em todas as amostras. A avaliação visual dos perfis cromatográficos revela diferenças marcantes entre as espécies analisadas.

Além disso, a comparação entre os métodos de extração aplicados à *Crotalaria ochroleuca* (Figuras 5 e 6) mostra que, embora os perfis globais apresentem semelhanças, a escolha do solvente influencia significativamente a quantidade de metabólitos extraídos. Isso evidencia o impacto direto do método de extração na composição química final dos extratos.

De forma geral, os cromatogramas confirmam não apenas a diversidade metabólica presente nas sementes de *Crotalaria*, mas também as variações químicas entre as espécies e entre os diferentes protocolos de extração. Esses perfis constituem a base essencial para a anotação de picos dos compostos e correlação com suas possíveis atividades biológicas.

1.4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DA *CROTALARIA JUNCEA* COM A *CROTALARIA SPECTABILIS*

A análise por realizada, associada ao modelo OPLS-DA, possibilitou uma discriminação robusta entre os perfis químicos das espécies *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea*. Os altos valores de explicação ($R^2Y = 82\%$) e predição ($Q^2 = 73\%$) reforçam a confiabilidade do modelo. A separação evidente na componente preditiva, ilustrada na Figura 9, revela uma divergência metabólica clara entre as duas espécies, refletindo diretamente em suas distintas atividades biológicas.

Do ponto de vista químico, ambas compartilham a capacidade biossintética de produzir alcaloides pirrolizidínicos (AP), metabólitos especializados derivados da necina. Em *C. spectabilis*, observou-se o predomínio da monocrotalina e de seus isômeros (m/z 326.16 e 308.15). Já *C. juncea* apresenta maior abundância de globiferina (m/z 370.19), também classificada como AP, embora com uma arquitetura estrutural consideravelmente distinta (COLEGATE *et al.*, 2012).

A monocrotalina é um alcaloide do tipo retronecina, caracterizado por uma estrutura macrocíclica 1,2-saturada que inclui uma ponte lactônica de 12 membros (diéster γ -butirolactônico) entre o grupo hidroxila da necina e o grupo carboxílico do ácido monocrotálico. Essa conformação semirrígida e apolar confere à molécula uma maior lipofilicidade relativa, favorecendo sua difusão passiva através de membranas biológicas lipídicas, fator determinante para sua biodisponibilidade frente a organismos-alvo, como nematoides (WILLIAMS; MOLYNEUX, 1987).

Além disso, a monocrotalina pode ser bioativada por oxidação hepática em organismos animais ou por enzimas oxidativas presentes em nematoides, resultando na formação de intermediários alquilantes altamente reativos, como os ésteres de pirrol. Esses metabólitos reativos ligam-se covalentemente a biomoléculas nucleofílicas, interferindo em funções celulares essenciais e promovendo a morte celular (SIPPEL, 1964).

Em contraste, embora também derivada da retronecina, a globiferina apresenta um núcleo estrutural altamente funcionalizado, com múltiplas hidroxilações (características de um poliol) e ligações glicosídicas adicionais, o que eleva significativamente sua polaridade. A presença de diversos grupos doadores de ligações de hidrogênio, somada à possível formação de extensas redes de solvatação, dificulta seu transporte passivo através de membranas biológicas. Além disso, sua rigidez conformacional e a complexidade estereoquímica podem comprometer a interação eficiente com sítios catalíticos de enzimas ou receptores específicos nos nematoides e plantas (COLEGATE *et al.*, 2012).

Essas evidências sugerem que a superior atividade biológica observada em *C. spectabilis* está intimamente relacionada às propriedades físicoquímicas e estereoeletrônicas da monocrotalina e de seus derivados, os quais favorecem o transporte pelas membranas biológicas, a bioativação metabólica e a interação eficaz com alvos celulares (SCUPINARI *et al.*, 2024). A geração de intermediários eletrofílicos reativos, como pirrois e iminas cíclicas, e a eficiência com que essas espécies alcançam seus alvos intracelulares são fortemente influenciadas pela organização tridimensional da molécula, pela distribuição de densidade eletrônica e pela acessibilidade dos grupos funcionais nucleofílicos nos sítios-alvo.

Em contraposição, os picos anotados de alcaloides em *C. juncea*, especialmente os mais polares como a globiferina, embora estruturalmente relacionados, aparentam carecer dos atributos moleculares essenciais descritos por HONÓRIO et al., (2025) para atravessar barreiras biológicas de forma eficiente e gerar intermediários suficientemente reativos capazes de induzir efeitos tóxicos agudos.

Dessa forma, este estudo não apenas reforça o potencial de *C. spectabilis* como fonte promissora de compostos naturais com ação biológica, mas também evidencia a relevância de abordagens fundamentadas em relações estrutura-atividade (SAR) e em propriedades moleculares preditivas para a triagem e o desenvolvimento de fitocompostos bioativos. Futuras investigações devem integrar metodologias complementares, como docking molecular, avaliação do logP, modelagem farmacofórica e estudos de metabolismo *in vitro*, a fim de elucidar com maior precisão os mecanismos moleculares que sustentam a atividade diferencial desses alcaloides pirrolizidínicos.

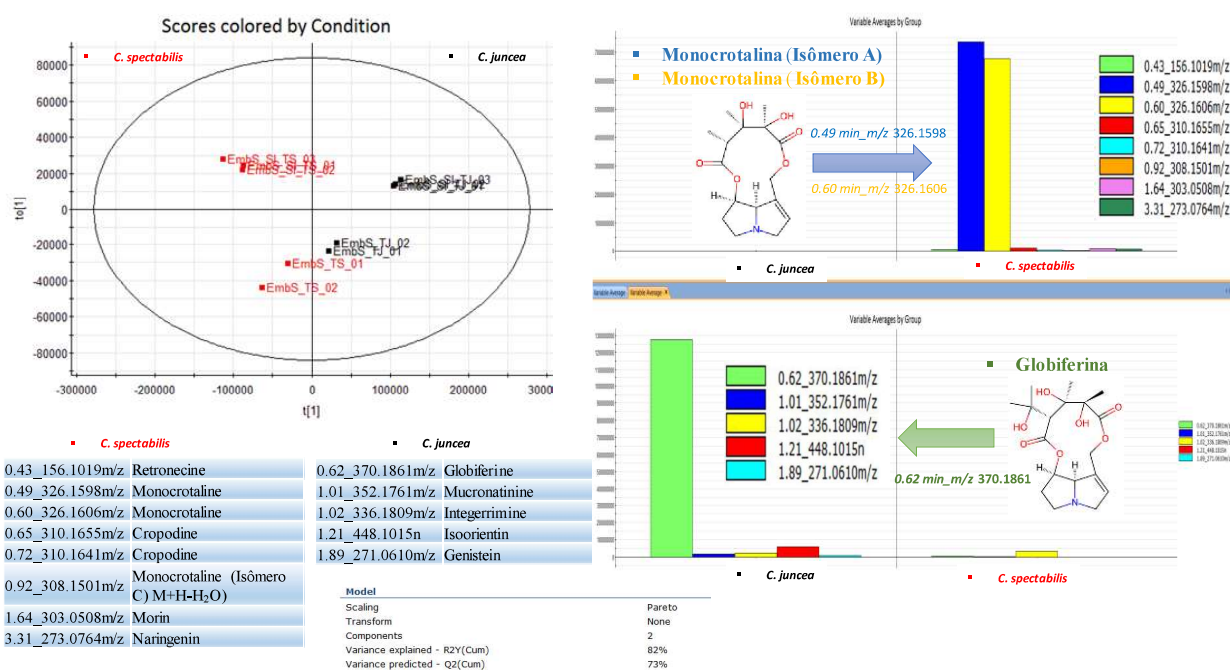


Figura 9. Análise OPLS-DA dos perfis metabólicos de *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea* por UPLC-HRMS, evidenciando clara separação entre as espécies.

Os principais compostos discriminantes foram alcaloides pirrolizidínicos, com predominância da monocrotalina e seus isômeros em *C. spectabilis* (espécie com atividade herbicida) e globiferina em *C. juncea* (com pouca atividade detectada). As diferenças estruturais entre esses compostos podem explicar a variação na atividade biológica observada.

1.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DE DUAS DIFERENTES EXTRAÇÕES DA *CROTALARIA OCHROLEUCA*

Com o objetivo de avaliar a influência do solvente extrator sobre o perfil químico obtido, os extratos de sementes de *Crotalaria ochroleuca* preparados com etanol e com solução aquosa ácida (água:HCl, 95:5) foram submetidos à análise estatística multivariada por OPLS-DA, uma ferramenta poderosa para a análise de dados metabolômicos. O modelo gerado, apresentado na Figura 10, revela uma separação clara e estatisticamente consistente entre os dois grupos de amostras. A distinção entre os agrupamentos no gráfico evidencia que a escolha do solvente exerce impacto direto e significativo sobre o perfil metabolômico final dos extratos.

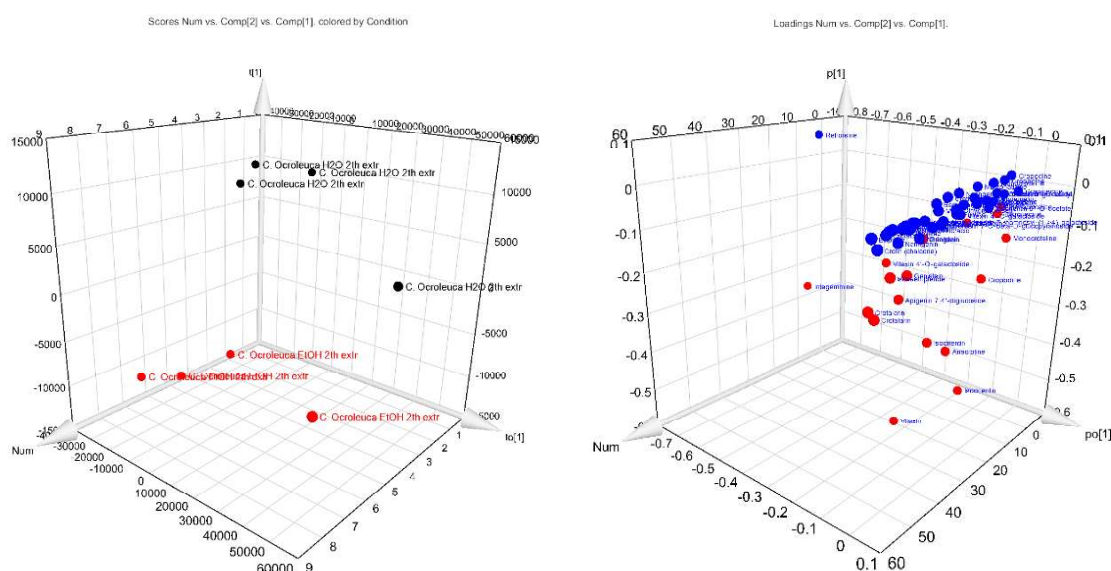


Figura 10. Análise OPLS-DA dos perfis metabólicos de *Crotalaria ochroleuca* por UPLC-HRMS extraída em álcool e com solução aquosa ácida (água:HCl, 95:5)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para investigar a variabilidade química entre as amostras submetidas a diferentes métodos de extração, sendo elas extração aquosa em meio ácido e extração etanólica. Revelando impacto profundo que o método de extração tem sobre o perfil químico final dos extratos de *C. ochroleuca*.

Essa separação, observada principalmente ao longo do primeiro componente principal (PC1), foi elucidada pelo gráfico de loadings, que mapeia a contribuição de cada variável, permitiu a anotação de picos dos metabólitos responsáveis por essa discriminação. A explicação química para essa diferenciação está relacionada às distintas afinidades dos solventes pelas diversas classes de metabólitos especializados presentes nas sementes.

Tabela 2. Compostos químicos presentes no extrato etanólico das sementes de *Crotalaria ochroleuca*

Tempo de retenção (min)	<i>m/z</i>	Descrição
0.43	156.10	Retronecina
0.49	326.1598	Monocrotalina
0.65	366.1915	Senkirkina
0.72	595.1666	Vitexina 4'-O-galactosídeo
0.80	310.1651	Cropodina
0.93	449.1086	Isoorientina
1.02	336.1809	Integerrimina
1.11	595.1669	Vitexina 4'-O-galactosídeo
1.11	352.1757	Anacrotina
1.21	449.1087	Isoorientina
1.22	433.1136	Vitexina
1.69	577.1562	Apigenina 7,4'-di-glicosídeo
2.01	271.0610	Genisteina
3.51	301.0717	Isokaempferida
4.35	339.1236	Crotalarina
6.22	339.1235	Crotalarina

A extração etanólica agrupou-se distintamente, o que é coerente com a maior afinidade do etanol por compostos de menor polaridade, como ácidos fenólicos menos polarizados e terpenoides. Esse agrupamento foi caracterizado por flavonoides e flavonoides glicosilados, como o Vitexina, o Isoorientina e o Crotalarina, cuja polaridade intermediária favorece sua solubilização em etanol.

Tabela 3. Compostos químicos presentes no extrato aquoso ácido das sementes de *Crotalaria ochroleuca*

Tempo de retenção (min)	<i>m/z</i>	Descrição
0.65	310.1655	Cropodina
0.69	352.1754	Retrorsina
0.72	310.1641	Cropodina
0.72	457.1114	Isovitexina 6"-O-acetil
0.92	308.1501	Monocrotalina
1.06	287.0558	Di-hidroquercetina
1.12	435.1298	Naringenina 7-O-beta-D-glicosídeo
1.12	154.0867	Crotanecina
1.18	305.0666	Di-hidroquercetina
1.23	323.1282	Crotina (chalcona)
1.36	303.0508	Morina
1.40	323.1284	Barbacarpan
2.30	323.1287	Crotina (chalcona)
3.84	334.1634	Anacrotina

Por outro lado, a extração com solução aquosa ácida constitui um método clássico e altamente seletivo para o isolamento de alcaloides (TZE TAK *et al.*, 2024). As amostras obtidas por extração aquosa em meio ácido apresentaram um agrupamento coeso em outra região do plano, indicando uma composição enriquecida em compostos mais polares ou sensíveis ao pH, como flavonoides glicosilados, aminoácidos e compostos fenólicos polares.

Verificou-se que essa extração foi fortemente influenciada por alcaloides pirrolizidínicos, como a Monocrotalina e a Retrorsina. Os alcaloides pirrolizidínicos, reconhecidos como os principais metabólitos especializados no gênero *Crotalaria* (RECH *et al.*, 2024), apresentam átomos de nitrogênio de caráter básico em sua estrutura. Em meio ácido, esses grupos nitrogenados são protonados, originando sais de amônio altamente solúveis em água. Esse princípio de extração baseado em reações ácido-base permite um enriquecimento seletivo e eficiente dessa classe de compostos, promovendo sua separação de outras substâncias menos polares presentes na matriz vegetal (TZE TAK *et al.*, 2024).

A extração aquosa em meio ácido mostra-se superior para estudos focados na atividade de alcaloides, enquanto a extração etanólica é mais indicada para a obtenção de um perfil

metabólico mais amplo. Essa constatação é crucial, pois reforça que os resultados de ensaios biológicos estão intrinsecamente ligados à metodologia de preparação da amostra, sendo um fator determinante para o sucesso de estudos com produtos naturais.

Esses resultados confirmam que a escolha do solvente de extração exerce um papel crítico na recuperação seletiva de metabólitos, o que pode ser explorado estrategicamente em estudos de caracterização química direcionada. Além disso, o perfil quimiométrico distinto obtido por PCA reforça a necessidade de metodologias analíticas otimizadas conforme o objetivo da investigação, seja ele voltado à atividade biológica, autenticação ou rastreamento metabólico.

1.5 CONCLUSÃO

A abordagem metabolômica adotada neste capítulo, fundamentada na técnica de UPLC-QTOF-MSE, foi eficaz na caracterização e distinção dos perfis químicos das sementes de diferentes espécies do gênero *Crotalaria*. A análise estatística multivariada (OPLS-DA) revelou diferenças metabólicas significativas entre as espécies, com destaque para a comparação entre *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea*. Embora ambas produzam alcaloides pirrolizidínicos, observou-se um perfil distinto desses compostos. A *C. spectabilis* apresentou predominância de monocrotalina e seus isômeros, enquanto *C. juncea* foi caracterizada pelo alto conteúdo de globiferina, sendo essa diferenciação responsável por sua atividade biológica.

Além disso, a comparação entre métodos de extração aplicados à *Crotalaria ochroleuca* demonstrou que a escolha do solvente influencia diretamente a composição química do extrato. A extração em meio ácido favoreceu a obtenção de um conjunto de metabólitos diferenciado em relação ao perfil obtido com o uso de etanol, evidenciando a seletividade dos solventes frente às diferentes classes de compostos.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA DO EXTRATO OBTIDO DAS SEMENTES DE CROTALARIA

2.1 INTRODUÇÃO

Devido a necessidade de reduzir as perdas na produção agrícola, torna indispensável o uso de agroquímicos no controle de pragas e plantas daninhas. Nesse contexto, o desenvolvimento de herbicidas com novos mecanismos de ação é fundamental para conter a crescente resistência das plantas daninhas aos produtos atualmente disponíveis. Além desses fatores, as plantas daninhas produzem toxinas que podem interferir no desenvolvimento normal da cultura. Elas são mais resistentes e tolerantes a estressores bióticos e abióticos (ESPOSITO *et al.*, 2021).

Para garantir alta produtividade, os pesticidas passaram a ser amplamente utilizados nos sistemas agrícolas intensivos. No entanto, esse uso excessivo tem levado ao acúmulo de resíduos acima dos níveis recomendados, o que representa um risco significativo para a saúde humana. Pesquisas sistemáticas resultaram na descoberta de novas moléculas com função herbicida, mais seletivas e menos nocivas ao ser humano e ao meio ambiente (ORŠOLIĆ *et al.*, 2021).

Nesse contexto, destaca-se o Manejo Integrado de Pragas (MIP), um conjunto de práticas agrícolas que visa o controle de pragas e doenças por meio da integração de diferentes tecnologias: monitoramento, uso de agroquímicos de forma racional e, principalmente, bioinsumos para o controle biológico (SAMPAIO *et al.*, 2023). O MIP surge como uma alternativa sustentável combinando estratégias biológicas, promovendo o uso responsável de pesticidas e incentivando métodos alternativos (FAROOQ *et al.*, 2024).

Sendo assim, os defensivos agrícolas são substâncias utilizadas para proteger as plantações contra ataques naturais de microrganismos, insetos e plantas daninhas. Esses produtos são desenvolvidos com finalidades específicas, sendo classificados conforme o tipo de praga que combatem, como inseticidas, fungicidas, herbicidas e acaricidas (SAMPAIO *et al.*, 2023).

Entre os principais fatores que comprometem a produtividade e a qualidade dos alimentos, as plantas daninhas se destacam. Elas competem com as culturas agrícolas por luz solar, água, espaço e nutrientes, afetando diretamente o desempenho das lavouras. (ESPOSITO *et al.*, 2021). Diante desse desafio, a indústria de agroquímicos tem investido, nos últimos anos, no desenvolvimento de herbicidas mais eficazes, seletivos e com menor impacto ambiental. Esses produtos, quando aplicados em concentrações adequadas, têm como objetivo inibir o crescimento ou eliminar as plantas invasoras, contribuindo para a eficiência e sustentabilidade da produção agrícola (SAMPAIO *et al.*, 2023).

Muitas plantas produzem, de forma natural, compostos com ação herbicida. Essas substâncias são sintetizadas como resposta a situações de competição por recursos ou como mecanismo de defesa contra predadores e outras ameaças do ambiente. Esses herbicidas naturais representam uma importante fonte de inspiração para o desenvolvimento de agroquímicos mais sustentáveis (MORAIS; VIEIRA, 2021).

Os extratos de produtos naturais podem servir como base para a obtenção de metabólitos especializados, a partir dos quais é possível desenvolver derivados sintéticos com diferentes aplicações. Em muitos casos, esses extratos apresentam atividade biológica superior ou distinta em comparação aos compostos isolados, devido à presença de uma complexa mistura de substâncias, como polifenóis, alcaloides, flavonoides e terpenoides (MATOS et al., 2023).

A avaliação de compostos bioativos com potencial para se tornarem herbicidas industriais envolve uma série de testes que exigem grandes volumes de amostras e recursos financeiros consideráveis. No entanto, as etapas iniciais dessa triagem podem ser conduzidas por meio de bioensaios simples em laboratório. Para esses testes preliminares, é comum a utilização de espécies vegetais que germinam com facilidade e apresentam crescimento rápido, facilitando a observação dos efeitos dos compostos.

Com o objetivo de investigar a atividade herbicida dos extratos obtidos, foram realizados experimentos no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os testes buscaram analisar os efeitos dos extratos das sementes de diferentes espécies de *Crotalaria* sobre o crescimento das raízes e da parte aérea das plantas selecionadas para o bioensaio.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de avaliar a atividade herbicida dos extratos obtidos a partir das sementes das espécies de *Crotalaria*, foram realizados experimentos no Departamento de Química da UFV. Analisando os efeitos das substâncias sobre o crescimento das plântulas de pepino (*Cucumis sativus*), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor*), braquiária (*Urochloa brizantha*) e picão (*Bidens pilosa* L.). Todas as sementes utilizadas foram obtidas comercialmente exceto as sementes de picão e sorgo.

As sementes de pepino, tomate e braquiária foram adquiridas em estabelecimentos comerciais, enquanto as sementes de sorgo e picão-preto foram cultivadas e fornecidas pelo Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As sementes de braquiária, lote: 04/24 foi obtida do fabricante Sementes Vilalvo Ltda com 97,7% de pureza. As sementes de pepino, lote: 098039, e as sementes de tomate, lote: 101733, foram obtidas do fabricante Agristar do Brasil Ltda com 90% de germinação e 99% de pureza para o pepino e 81% de germinação e 99% pureza para o tomate, exemplificados na tabela abaixo.

Tabela 4. Informações complementares das sementes

Semente	Lote	Germinação (%)	Pureza (%)	Marca
Pepino caipira	098039	90	99	Topseed
Tomate Santa Adélia Super	101733	81	99	Topseed
Sorgo forrageiro	-	90	90	-
Picão preto	-	90	90	-
<i>Brachiaria brizantha</i>	04/24	97,7	-	Germimax

2.2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque (1000 ppm) para cada substância testada foram preparadas em solução aquosa de DMSO 0,3% (v/v) (SIGMA ALDRICH). A massa de cada composto foi calculada para o preparo de 200 mL de cada solução estoque (1000 ppm), sendo 75 mL utilizados para o teste de maior concentração e o restante usado na diluição para obtenção das outras concentrações (600 ppm, 300 ppm, 150 ppm e 75 ppm).

Como os extratos utilizados para a realização do ensaio biológico foram obtidos da extração bruta das sementes, um conjunto de compostos, não é possível determinar sua massa molar. Por esse motivo os cálculos foram realizados usando Partes Por Milhão (ppm) que é uma unidade de concentração utilizada para expressar a quantidade de uma substância (soluto) em relação a um total (solução ou solvente).

Além disso, para fins de comparação, o mesmo teste foi realizado utilizando duas substâncias padrões de Monocrotalina e Quercetina, com a finalidade de comparar os resultados dos extratos brutos com duas substâncias isoladas sendo a Monocrotalina um alcaloide e a Quercetina um flavonoide. Vale ressaltar que essa comparação é qualitativa e de efeito geral, não uma comparação direta de potência molar. Ambas as substâncias foram compradas comercialmente.

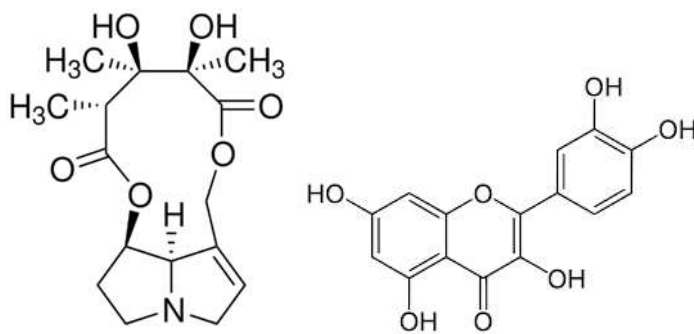


Figura 11. Estrutura da Monocrotalina e da Quercetina, respectivamente

Sendo assim, os cálculos das massas pesadas para preparar as soluções estoque de 1000 ppm foram realizados de acordo com a equação (1):

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ parte de soluto}}{10^6 \text{ parte de solução}} \quad (1)$$

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ L}} = \frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ L}}$$

Portanto, em 200 mL de solução teremos 0,2 g de extrato bruto diluídos em solução aquosa de DMSO 0,3% (v/v).

As demais soluções com concentrações de 600 ppm, 300 ppm, 150 ppm e 75 ppm foram preparadas a partir da diluição das soluções estoques de 1000 ppm utilizando a equação (2):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (2)$$

Onde C_1 é a concentração da solução 1 em ppm, V_1 é o volume da solução 1 em L, C_2 é a concentração da solução 2 em ppm e V_2 é o volume da solução 2 em L.

A massa calculada para cada extrato testado é mostrada na tabela abaixo. Todos os cálculos acima foram realizados igualmente para as substâncias isoladas para que a comparação no final fosse feita de maneira justa.

Tabela 5. Identificação e massas utilizadas para o preparo das soluções estoque de 1000 ppm dos extratos testados

Extratos e Substâncias	Identificação	Massa (g)
T1	<i>C. ochroleuca</i> em álcool 1° extração	0,2035
T2	<i>C. ochroleuca</i> em água 1° extração	0,2018
T3	<i>C. ochroleuca</i> em álcool 2° extração	0,2074
T4	<i>C. ochroleuca</i> em água 2° extração	0,2045
T5	<i>C. juncea</i> em álcool	0,2055
T6	<i>C. spectabilis</i> em álcool	0,2023
T7	<i>C. breviflora</i> em álcool 1° extração	0,2065
T8	<i>C. breviflora</i> em álcool 2° extração	0,2009
T9	<i>C. breviflora</i> em água	0,2041
Quercetina	-	0,2004
Monocrotalina	-	0,2006

2.2.2 PREPARO DO BIOENSAIO COM SEMENTES

O experimento foi conduzido em placas de Petri com 90mm de diâmetro, contendo papel de germinação e 20 sementes de cada cultura por placa. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL das soluções previamente preparadas em cada uma das placas. Após esse processo, as placas foram devidamente identificadas, vedadas com plástico filme e colocadas em uma câmara de germinação (B.O.D. - Incubadora de Demanda Biológica de Oxigênio) a 25 °C, sem exposição à luz, por um período de 5 dias. No caso das plantas daninhas picão e braquiária, que apresentam germinação mais lenta, o tempo de incubação foi estendido para 10 dias.

Finalizado o período de incubação, as placas foram retiradas da B.O.D. e armazenadas a -10 °C por 24 horas, com o objetivo de interromper o crescimento das plântulas. O congelamento também facilita o manuseio das mesmas. Após o descongelamento, as plântulas foram cuidadosamente esticadas sobre uma placa de borracha com fundo preto (FIGURA 12) e fotografadas. O comprimento das plântulas foi medido utilizando o software ImageJ.



Figura 12. Plântulas de sorgo obtidas para o extrato T5 na concentração 150 ppm

O crescimento radicular e da parte aérea foram avaliados e as medidas dos valores foram comparados ao crescimento do controle negativo que continha somente a solução com dimetilsulfóxido (0,3% v/v). Esse experimento, foi realizado em triplicata para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Como controle positivo utilizou-se o herbicida comercial DUAL GOLD comercializado pela empresa Syngenta®, adicionando soluções aquosas com as mesmas concentrações utilizadas no bioensaio citado acima, 1000 ppm, 600 ppm, 300 ppm, 150 ppm e 75 ppm e testado sobre as mesmas culturas. Foi utilizado o herbicida comercial Dual Gold® por ser um produto pré-emergente de amplo espectro e com mecanismo de ação bem estabelecido. Dessa forma, serviu como referência de elevada eficácia para a condução dos bioensaios.

O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição de acordo com a equação (3):

$$\%_{inibição} = \left(\frac{xP - \bar{x}C}{\bar{x}C} \right) \cdot 100\% \quad (3)$$

Onde $\bar{x}_P$ é o valor médio do crescimento da plântula e $\bar{x}_C$ é o valor médio do crescimento do controle. Os valores positivos indicam estímulo ao crescimento e os valores negativos indicam inibição.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos das plantas de diferentes espécies de *Crotalaria* descritos no capítulo 1, tiveram sua atividade inibitória avaliada de forma seletiva por terem sido utilizadas cultura monocotiledônea (sorgo e braquiária) e cultura dicotiledônea (tomate, pepino e picão), juntamente com as substâncias isoladas de Monocrotalina e Quercetina.

Essas culturas apresentam resposta, mesmo em baixas concentrações dos princípios ativos, a curto prazo. Sementes de culturas comerciais são geneticamente homogêneas, germinando de forma uniforme. Além disso, optou-se por selecionar sementes de culturas alimentares em comparação com sementes de ervas daninhas. As sementes de cultura são mais fáceis de trabalhar e de analisar nesse tipo de experimento por isso foram incluídas.

Os resultados do bioensaio foram apresentados em gráficos de barras, com seus respectivos valores de desvio padrão. Os valores dos efeitos dos extratos (1-9) e das substâncias sobre o desenvolvimento das plântulas em relação ao controle positivo, Dual Gold, foram disponibilizados em tabelas. Sendo os valores positivos referentes ao estímulo ao crescimento dessas plântulas e os valores negativos referentes a inibição do crescimento.

Vale ressaltar que o controle positivo utilizado, o herbicida comercial Dual Gold, demonstrou altos níveis de inibição em todas as concentrações testadas e em todas as culturas estudadas, atingindo aproximadamente 90% de inibição em sua concentração máxima em quase todas as culturas usadas para essa análise. Esse padrão confirma sua elevada eficiência, servindo como referência para os demais tratamentos.

2.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS (1-9) E DAS SUBSTÂNCIAS MONOCROTALINA E QUERCETINA SOBRE O CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE PEPINO (*CUCUMIS SATIVUS*)

Analisando os resultados apresentados no gráfico (Figura 13) e na Tabela 6, pode-se afirmar que todas os extratos (1-9) influenciaram no crescimento das plântulas de pepino. Houve inibição do crescimento em praticamente todas as concentrações dos extratos testados exceto para a substância T7 para a concentração de 1000 ppm que houve estimulação do crescimento.

Os extratos que mais se mostraram ativos e tiveram uma atividade significativa de inibição do crescimento dessas plântulas, foram os extratos T1, T2, T8 e T9 com os melhores resultados mesmo nas concentrações mais baixas. Observa-se que os compostos possuem uma melhor inibição do crescimento radicular das plântulas, muito próximo do controle positivo utilizado para a comparação.

Tabela 6. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-79.92	-80.46	-70.95	-75.15	-82.75
T2	-77.36	-81.28	-84.20	-70.56	-73.57
T3	-73.94	-82.18	-32.77	-14.95	-17.35
T4	-68.72	-69.49	-79.00	-78.41	-73.69
T5	-24.52	-38.74	-5.55	-38.43	-77.70
T6	-78.02	-83.52	-14.70	-24.28	-47.37
T7	5.18	-25.20	-20.92	-0.11	-22.47
T8	-89.52	-73.38	-80.52	-88.29	-73.24
T9	-69.01	-80.08	-80.98	-83.11	-64.00
Quercetina	-73.93	-86.41	-28.48	-49.72	-43.02
Monocrotalina	-29.56	-28.82	-5.74	-75.14	-71.82
Dual Gold	-76.20	-87.31	-84.87	-88.19	-92.72

Analisando a tabela é possível constatar os extratos T1, T2 e T3 obtiveram resultados próximos a 80% de inibição mesmo em uma concentração baixa de 150 ppm, sendo esse resultado muito próximo ao apresentado pelo Dual Gold, o controle positivo. Além disso, a quercetina se mostrou mais eficiente em concentrações mais baixas, 86% em 150 ppm, enquanto a Monocrotalina teve uma maior inibição em concentrações mais elevadas, 75% em 600 ppm. Vale ressaltar que os extratos T8 e T9 também obtiveram resultados excelentes, sendo o T8 o melhor resultado, chegando a quase 90% na concentração mais baixa.

Tabela 7. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de pepino

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,37	0,63	0,22	0,77	0,55
T2	0,55	0,48	0,35	0,54	0,54
T3	0,32	0,62	2,15	0,31	0,64
T4	0,40	0,33	0,30	0,38	0,25
T5	1,82	1,41	0,50	1,20	0,21
T6	0,16	0,40	0,72	1,50	0,47
T7	0,47	1,73	1,34	0,50	1,15
T8	0,23	0,53	0,31	0,14	0,77
T9	0,69	0,23	0,41	0,23	0,20
Quercetina	0,51	0,39	2,33	0,93	0,49
Monocrotalina	0,73	2,60	0,84	0,39	0,25
Dual Gold	0,58	0,11	0,35	0,26	0,02

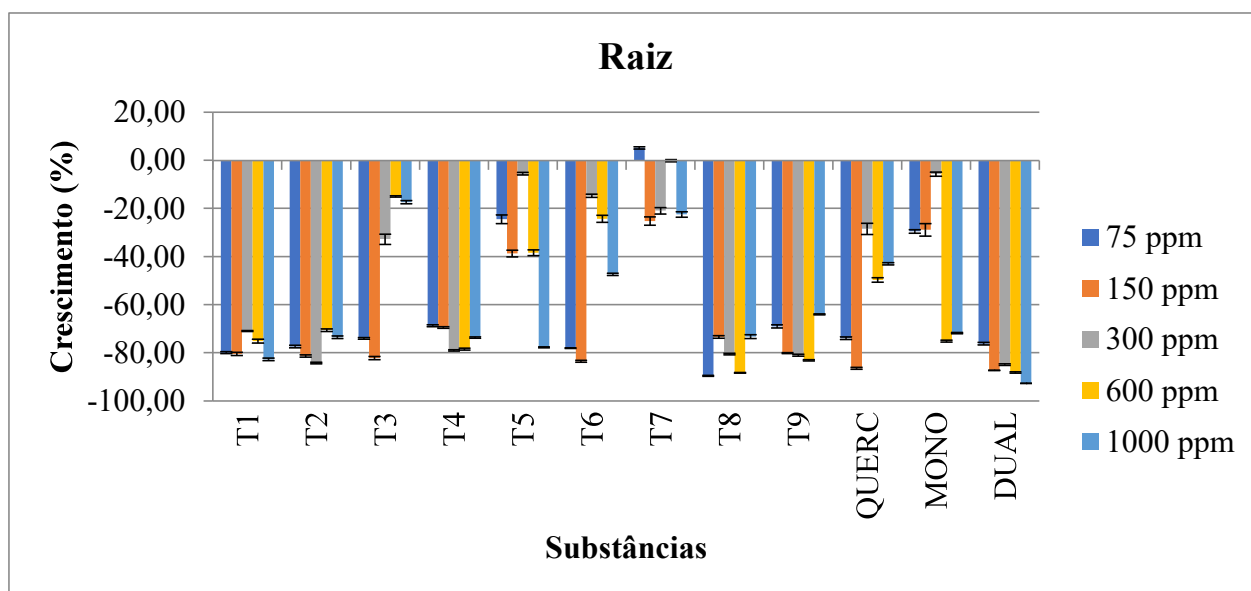


Figura 13. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold

Tabela 8. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-59.75	-56.12	-28.18	-48.47	-56.23
T2	-33.38	-48.31	-51.59	-20.54	-25.53
T3	-30.20	-45.69	46.31	78.69	65.67
T4	-14.81	-23.70	-33.13	-32.23	-21.40
T5	29.57	11.82	91.82	30.00	-33.86
T6	-42.52	-48.63	69.45	44.20	-5.91
T7	89.01	40.86	67.15	77.49	42.53
T8	-76.82	-26.79	-40.72	-48.18	-12.77
T9	-19.81	-39.52	-48.62	-56.40	-13.38
Quercetina	-41.39	-75.53	33.74	-15.83	5.26
Monocrotalina	47.20	-1.68	67.31	-44.70	-44.95
Dual Gold	-55.95	-82.49	-72.53	-85.71	-97.75

Para a parte aérea das plântulas os extratos que mais apresentaram inibição foi o T8, com uma inibição de aproximadamente 76% em 75 ppm. Alguns extratos estimularam o crescimento da parte aérea das sementes, mas não significativamente dado que as raízes foram inibidas de forma considerável, impedindo que as plantas se desenvolvessem.

Tabela 9. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de pepino

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,48	0,77	0,17	0,57	0,53
T2	0,42	0,41	0,44	0,65	0,45
T3	0,23	0,52	1,47	0,78	1,04
T4	0,28	0,25	0,05	0,23	0,21
T5	1,56	1,41	0,17	0,53	0,06
T6	0,01	0,35	0,14	0,94	0,86
T7	0,19	1,63	0,88	0,29	0,73
T8	0,18	0,53	0,45	0,13	0,77
T9	0,36	0,17	0,30	0,27	0,12
Quercetina	0,52	0,14	1,38	0,73	0,22
Monocrotalina	0,61	1,78	0,65	0,33	0,29
Dual Gold	0,62	0,33	0,44	0,26	0,05

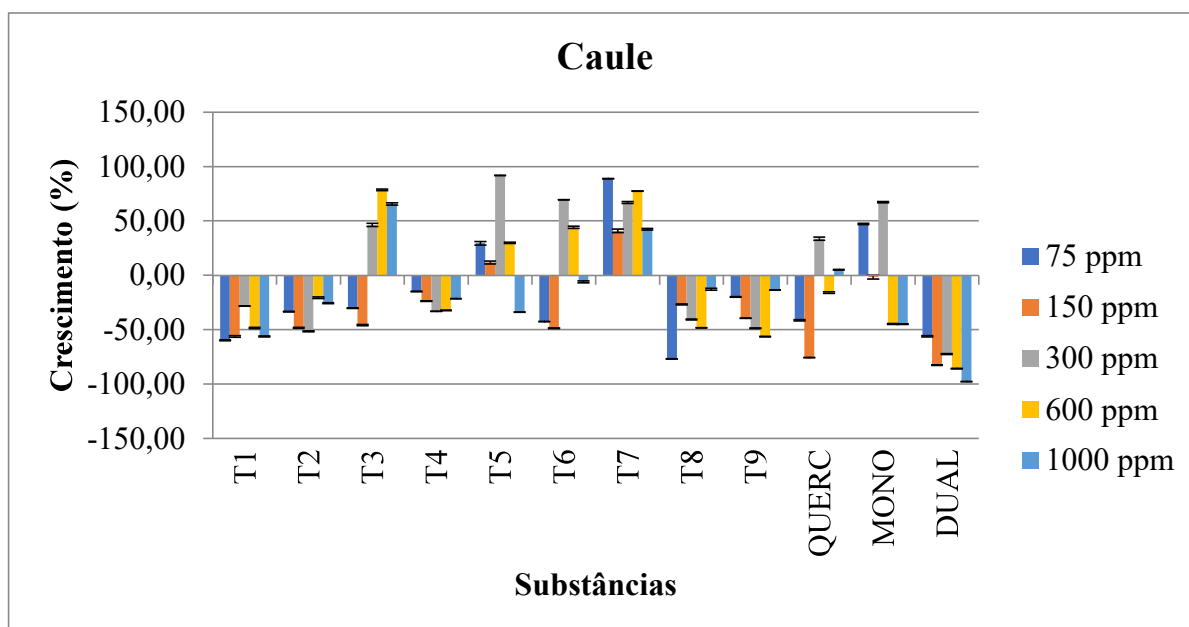


Figura 14. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de pepino em relação ao controle Dual Gold

2.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS (1-9) E DAS SUBSTÂNCIAS MONOCROTALINA E QUERCETINA SOBRE O CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM L.*)

Com base na análise dos resultados apresentados no gráfico (Figura 15) e na Tabela 8, pode-se afirmar que todos os extratos testados (1 a 9) influenciaram o crescimento das plântulas. Observou-se inibição do crescimento em todas as concentrações avaliadas. Todos os extratos apresentaram uma inibição próxima uma das outras mesmo em concentrações diferentes. Destaca-se ainda que esses extratos mostraram uma inibição mais acentuada no crescimento radicular das plântulas, com efeitos até melhores que o do controle positivo utilizado como referência.

Tabela 10. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-85.72	-85.86	-81.64	-89.51	-84.69
T2	-85.80	-78.89	-87.82	-87.72	-87.88
T3	-86.77	-89.83	-87.48	-94.59	-96.98
T4	-89.18	-90.60	-87.49	-86.92	-90.15
T5	-87.74	-88.86	-87.57	-89.67	-90.42
T6	-87.48	-84.28	-88.91	-88.92	-91.37
T7	-91.39	-85.75	-86.01	-85.83	-83.72
T8	-87.59	-91.15	-89.31	-90.91	-91.19
T9	-86.03	-86.14	-86.20	-83.79	-88.83
Quercetina	-89.13	-83.32	-81.44	-85.80	-85.86
Monocrotalina	-88.22	-82.74	-78.38	-83.16	-85.54
Dual Gold	-69.08	-75.60	-84.94	-89.05	-89.61

A análise da tabela revela que todos os extratos apresentaram níveis de inibição acima de 78% mesmo em baixas concentrações. A Quercetina e a Monocrotalina desempenharam papéis semelhantes na inibição chegando a 89% e 88% de inibição respectivamente.

Tabela 11. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de tomate

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,07	0,11	0,41	0,09	0,14
T2	0,14	0,50	0,03	0,05	0,23
T3	0,21	0,14	0,19	0,09	0,02
T4	0,17	0,15	0,24	0,04	0,06
T5	0,10	0,09	0,19	0,08	0,07
T6	0,13	0,11	0,11	0,05	0,15
T7	0,06	0,12	0,08	0,12	0,17
T8	0,11	0,20	0,05	0,09	0,04
T9	0,10	0,28	0,19	0,21	0,10
Quercetina	0,22	0,04	0,10	0,16	0,11
Monocrotalina	0,07	0,05	0,07	0,13	0,05
Dual Gold	0,25	0,09	0,09	0,10	0,12

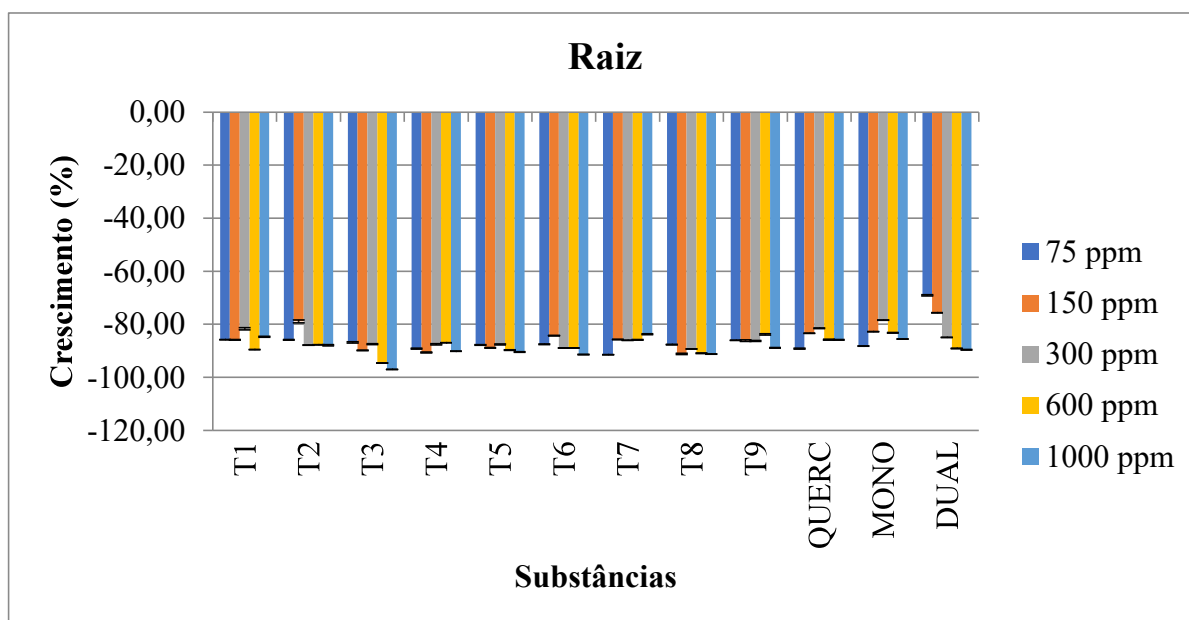


Figura 15. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold

Tabela 12. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-32.75	-41.61	-46.13	-50.21	-36.10
T2	-37.79	-37.07	-47.38	-37.67	-50.62
T3	-50.58	-53.19	-48.75	-93.39	-96.72
T4	-56.55	-54.53	-47.13	-29.86	-55.75
T5	-44.62	-41.10	-49.37	-58.65	-57.04
T6	-44.22	-35.96	-58.52	-53.48	-76.97
T7	-57.65	-36.11	-37.01	-34.92	-37.58
T8	-37.52	-53.57	-49.06	-61.94	-61.23
T9	-23.76	-32.67	-39.26	-22.26	-43.90
Quercetina	-51.91	-30.96	-28.62	-43.86	-36.45
Monocrotalina	-34.65	-33.28	-40.47	-51.29	-68.25
Dual Gold	-59.69	-51.01	-64.72	-85.48	-93.26

Dentre os extratos analisados para inibição da parte aérea, T3 se destaca pela alta inibição nas maiores concentrações, rivalizando com o controle positivo. Os extratos T1, T2, T5, T6 e T8 também mostraram desempenho consistente. T9 foi o menos eficaz. Em relação aos compostos isolados, Quercetina mostrou-se mais potente em baixas concentrações, enquanto Monocrotalina se destacou nas doses mais altas.

Tabela 13. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de tomate

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,19	0,46	0,08	0,48	0,24
T2	0,11	0,25	0,31	0,30	0,82
T3	0,52	0,58	0,65	0,04	0,06
T4	0,38	0,48	0,95	0,06	0,57
T5	0,33	0,12	0,34	0,46	0,24
T6	0,26	0,33	0,23	0,30	0,40
T7	0,19	0,28	0,47	0,25	0,16
T8	0,30	0,81	0,09	0,26	0,26
T9	0,32	0,27	0,28	0,32	0,27
Quercetina	0,51	0,11	0,10	0,26	0,06
Monocrotalina	0,53	0,08	0,22	0,12	0,22
Dual Gold	0,04	0,20	0,24	0,15	0,08

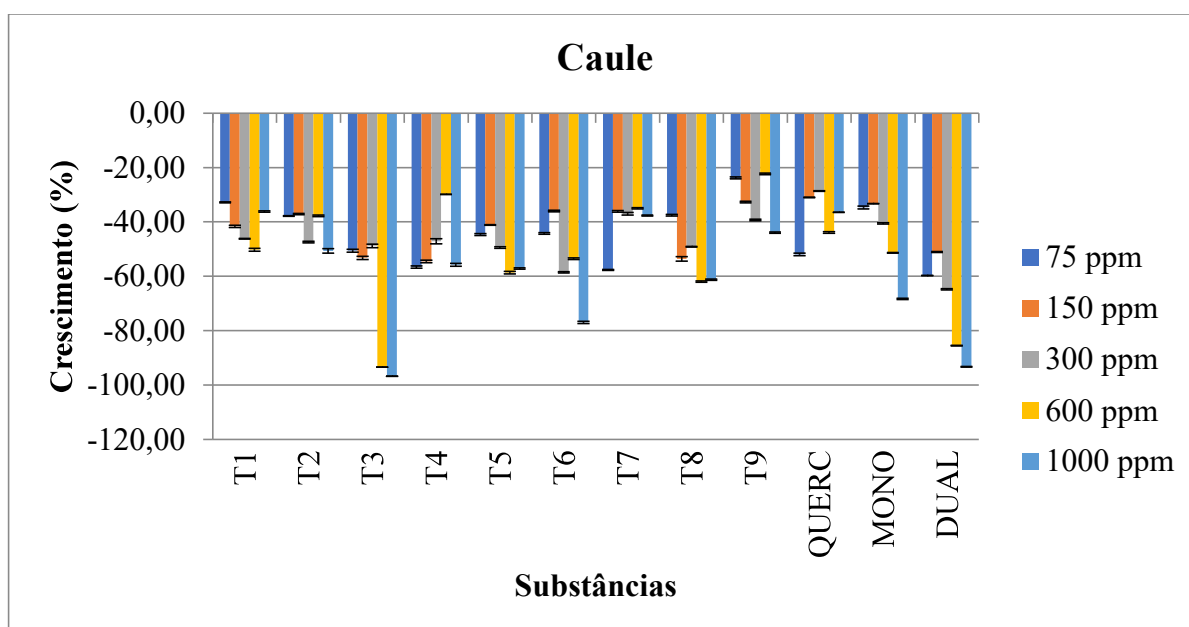


Figura 16. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de tomate em relação ao controle Dual Gold

2.3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS (1-9) E DAS SUBSTÂNCIAS MONOCROTALINA E QUERCETINA SOBRE O CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE SORGO (*SORGHUM BICOLOR*)

Com base nos dados da Figura 17 e da tabela 10, observa-se que a maioria dos extratos e substâncias testadas apresentou efeito inibitório significativo sobre o crescimento das plântulas, variando em intensidade conforme a concentração utilizada.

Os resultados indicam que os extratos T1, T2, T3 e T8 apresentam potencial herbicida significativo, sendo especialmente eficazes na inibição do crescimento radicular das plântulas, com destaque para o extrato T3, que apresentou efeito similar ao herbicida comercial. O comportamento atípico do extrato T7 sugere a necessidade de investigação adicional quanto à possibilidade de efeitos que causam estimulação em altas doses.

Tabela 14. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-86.93	-85.12	-86.81	-87.35	-90.32
T2	-85.87	-80.56	-76.99	-82.45	-85.80
T3	-87.17	-89.66	-92.86	-98.65	-100.00
T4	-78.30	-66.83	-71.75	-76.67	-73.32
T5	-23.91	-15.79	-31.26	-49.72	-76.73
T6	-63.77	-73.51	-80.55	-66.46	-80.41
T7	-61.96	-76.65	-62.66	-32.74	-9.48
T8	-52.11	-63.93	-73.22	-94.35	-86.89
T9	-18.59	-17.25	-26.71	-40.24	-71.17
Quercetina	-36.99	-51.37	-40.09	-49.21	-48.34
Monocrotalina	-76.67	-79.82	-81.40	-90.75	-83.99
Dual Gold	-72.77	-83.19	-87.37	-94.34	-98.48

O extrato T3 foi o mais ativo, com inibição total (100%) a 1000 ppm. Os extratos T1 e T2 mostraram alta inibição em todas as concentrações, enquanto o extrato T8 teve efeito crescente com a dose, destacando-se a partir de 600 ppm. A Monocrotalina também apresentou

forte atividade, especialmente a 600 ppm (90,75%). Esses resultados indicam alto potencial inibitório das raízes, com desempenho semelhante ao herbicida comercial.

Tabela 15. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de sorgo

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,16	0,27	0,16	0,29	0,27
T2	0,08	0,40	0,22	0,23	0,39
T3	0,04	0,06	0,27	0,06	0,00
T4	0,32	0,56	0,40	0,60	0,69
T5	0,60	0,68	1,10	1,06	0,23
T6	0,43	0,38	0,04	0,14	0,49
T7	1,04	0,75	0,95	1,25	0,21
T8	1,60	0,06	0,17	0,05	0,27
T9	0,97	0,52	0,15	0,71	0,68
Quercetina	1,35	1,12	1,69	1,13	1,33
Monocrotalina	0,36	0,18	0,61	0,33	0,37
Dual Gold	0,62	0,36	0,20	0,09	0,05

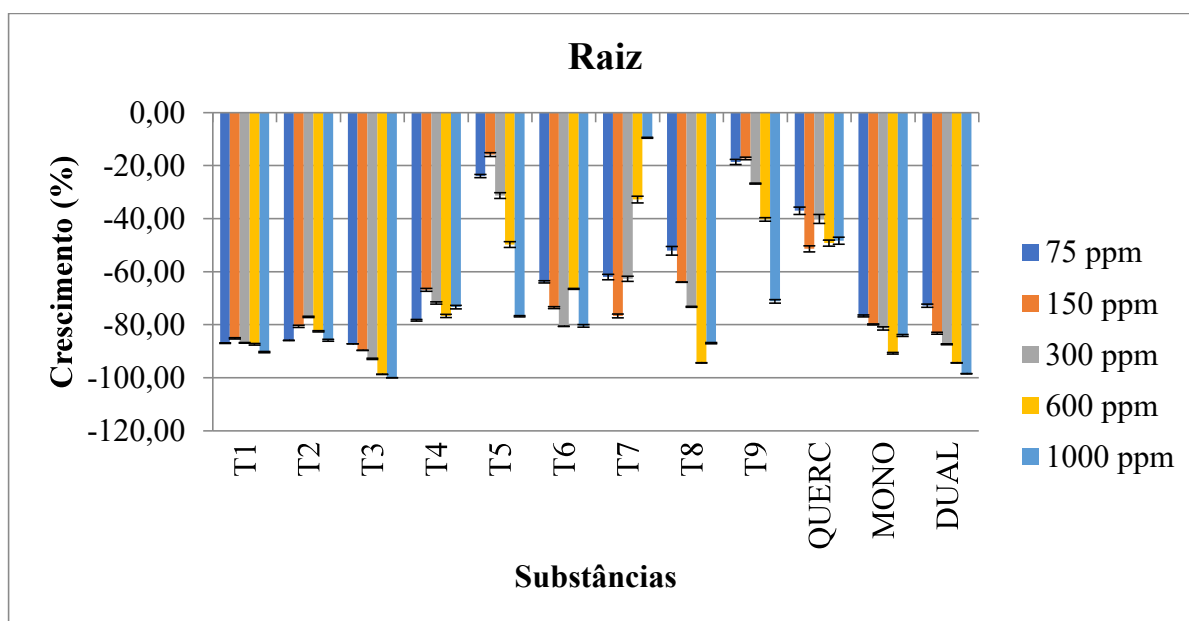


Figura 17. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold

Tabela 16. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-63.50	-69.41	-70.83	-70.83	-73.42
T2	-73.49	-55.45	-49.27	-53.26	-64.60
T3	-69.56	-72.53	-85.56	-83.48	-89.42
T4	-52.29	-39.58	-39.75	-52.50	-45.98
T5	-17.92	-4.17	-18.29	-22.04	-45.46
T6	-48.15	-54.83	-55.44	-48.15	-66.61
T7	-41.59	-53.06	-35.94	-19.54	-0.13
T8	-28.80	-38.03	-43.66	-78.18	-68.95
T9	-6.40	5.60	-4.10	-28.29	-50.56
Quercetina	-15.51	-26.18	-25.27	-26.57	-35.92
Monocrotalina	-61.58	-67.70	-68.09	-68.60	-72.14
Dual Gold	-66.61	-76.86	-82.95	-90.13	-94.98

Os extratos T3, T1, T2 e T8, junto com a substância Monocrotalina, foram os mais eficazes na inibição do crescimento da parte aérea das plântulas, com destaque para o extrato T3 que alcançou 89,42% de inibição a 1000 ppm, valor próximo ao herbicida comercial. O extrato T1 apresentou inibição constante entre 63% e 73%, enquanto a Monocrotalina teve resultados semelhantes. O extrato T2 mostrou maior inibição nas concentrações mais baixas e altas, e o extrato 8 apresentou efeito crescente com a dose. Os extratos T4, T5, T7, T9 e a Quercetina tiveram baixa ou irregular inibição, com o extrato T7 apresentando quase nenhuma atividade.

Tabela 17. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de sorgo

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,40	0,36	0,36	0,53	0,24
T2	0,16	0,47	0,46	0,42	0,22
T3	0,13	0,32	0,22	0,39	0,18
T4	0,57	0,29	0,39	0,56	0,97
T5	0,80	1,36	0,63	0,80	0,52
T6	0,33	0,67	0,37	0,44	0,45
T7	0,78	0,83	1,14	1,03	0,28
T8	1,68	0,40	0,11	0,10	0,37
T9	0,61	0,77	0,32	0,36	0,32
Quercetina	1,58	0,48	1,06	0,93	0,98
Monocrotalina	0,54	0,25	0,43	0,38	0,23
Dual Gold	0,41	0,35	0,11	0,04	0,09

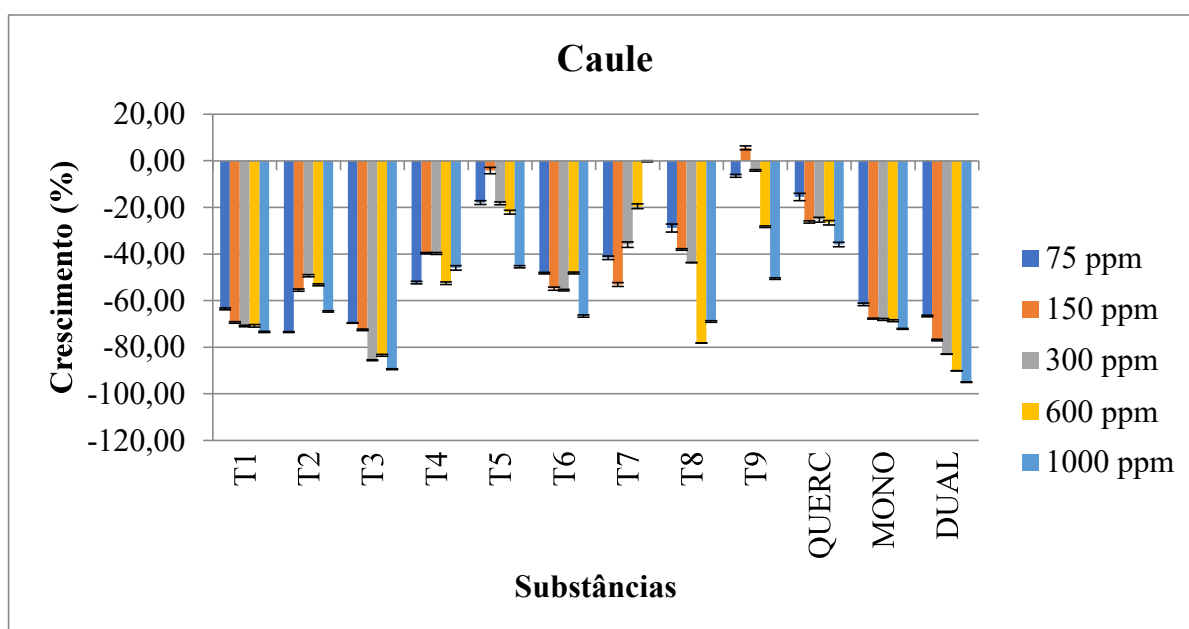


Figura 18. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de sorgo em relação ao controle Dual Gold

2.3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS (1-9) E DAS SUBSTÂNCIAS MONOCROTALINA E QUERCETINA SOBRE O CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE BRAQUIÁRIA (*UROCHLOA BRIZANTHA*)

A análise dos resultados apresentados no gráfico 19 e na tabela 12, demonstra que todos os extratos (T1 a T9) interferiram no crescimento das raízes das plântulas de braquiária. Observou-se inibição do crescimento em todas as concentrações testadas. Embora alguns extratos tenham apresentado variação nos efeitos ao longo das concentrações, os extratos T2, T3, T5, T6 e T9, além da Monocrotalina, mostraram-se eficazes na inibição das raízes. A Monocrotalina, em especial, apresentou desempenho igual ao herbicida sintético, reforçando seu potencial como composto bioativo.

Tabela 18. Efeito dos extratos das sementes de Crotalaria (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-53.25	-48.49	-51.78	-46.45	-67.37
T2	-70.02	-77.12	-68.94	-88.57	-74.70
T3	-72.01	-62.24	-69.57	-75.01	-44.97
T4	-79.78	-75.07	-66.60	-39.94	-58.37
T5	-64.30	-80.44	-81.16	-74.64	-63.24
T6	-56.64	-60.18	-76.65	-75.34	-62.80
T7	-49.13	-57.00	-75.19	-59.91	-60.47
T8	-69.25	-15.80	-30.41	-61.58	-82.67
T9	-79.29	-76.67	-76.75	-69.07	-41.31
Quercetina	-35.23	-20.40	-56.15	-40.90	-23.23
Monocrotalina	-59.31	-80.87	-80.48	-93.13	-93.07
Dual Gold	-59.31	-80.87	-80.48	-93.13	-93.07

Entre os extratos testados, T2, T3, T5, T6 e T9 apresentaram os melhores resultados na inibição das plântulas. O extrato T2 destacou-se com forte inibição, especialmente a 600 ppm (88,57%). O extrato T5 também foi eficiente, com inibição acima de 80% entre 150 e 300 ppm. O extrato T3 teve boa atividade nas concentrações intermediárias, com até 75% a 600 ppm. Os

extratos T6 e T9 mostraram inibição consistente, com valores entre 60% e 76%, principalmente nas concentrações mais baixas e intermediárias.

A substância Monocrotalina obteve os melhores resultados gerais, com inibição máxima de 93,13% a 600 ppm, igualando o desempenho do herbicida comercial Dual Gold. Já a quercetina apresentou atividade significativamente menor, com inibição máxima de apenas 56,15% a 300 ppm.

Tabela 19. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de braquiária

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,89	0,70	0,32	0,26	0,60
T2	0,07	0,25	0,10	0,16	0,27
T3	0,27	0,57	0,12	0,44	0,29
T4	0,15	0,18	0,55	0,29	0,65
T5	0,42	0,14	0,14	0,21	0,43
T6	0,32	0,35	0,17	0,38	0,23
T7	0,60	0,52	0,25	0,21	0,18
T8	0,64	1,10	0,92	0,54	0,22
T9	0,35	0,12	0,30	0,67	0,55
Quercetina	0,18	0,58	0,52	1,01	0,54
Monocrotalina	0,83	0,08	0,30	0,03	0,09
Dual Gold	0,57	0,21	0,36	0,09	0,00

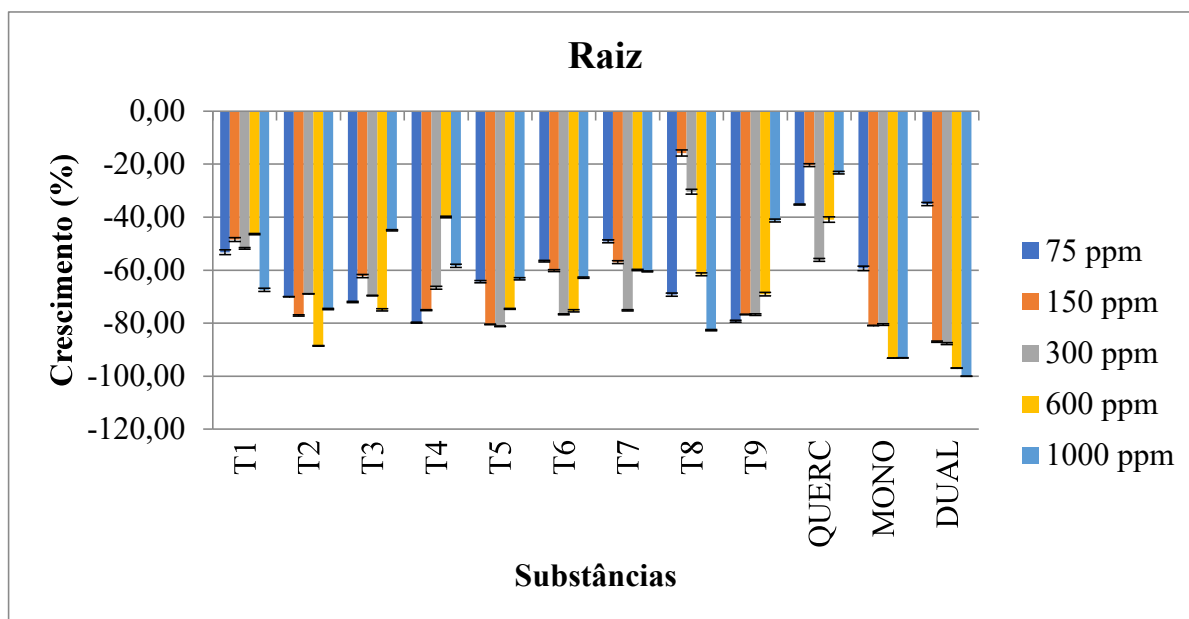


Figura 19. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold

Tabela 20. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-35.10	-46.93	-37.49	-35.55	-53.72
T2	-55.68	-59.64	-53.65	-85.45	-49.68
T3	-54.17	-14.09	-48.52	-54.80	5.35
T4	-68.99	-54.77	-44.00	0.11	-49.34
T5	-41.93	-46.97	-44.46	-56.09	-37.29
T6	-8.07	-41.34	-62.99	-50.01	-37.25
T7	-17.13	-33.19	-47.31	-24.27	-36.08
T8	-54.04	-17.13	-30.85	-52.00	-59.05
T9	-53.55	-63.47	-61.16	-36.93	-48.08
Quercetina	-41.98	-10.58	-57.58	-45.67	-30.39
Monocrotalina	-42.12	-64.15	-56.97	-84.81	-74.74
Dual Gold	-85,36	-96,33	-94,90	-98,46	-100,00

Na parte aérea das plântulas, os extratos T2, T4, T6 e T9 apresentaram os melhores resultados, com destaque para o T2, que atingiu 85,45% de inibição a 600 ppm. O extrato T4 teve alta inibição a 75 ppm, e T6 e T9 mostraram efeitos consistentes em concentrações intermediárias. A Monocrotalina obteve inibição próxima ao herbicida Dual Gold, reforçando seu alto potencial herbicida. Em contraste, a Quercetina apresentou baixa atividade, e alguns extratos, como T3 e T4, mostraram efeitos irregulares ou até estímulo em doses mais altas.

Tabela 21. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de braquiária

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	1,20	1,03	0,57	0,25	0,76
T2	0,34	0,37	0,28	0,21	0,32
T3	0,25	1,81	0,39	0,91	0,93
T4	0,36	0,36	0,69	0,88	1,15
T5	0,75	0,66	0,42	0,72	0,90
T6	0,45	0,62	0,31	0,97	0,44
T7	1,20	0,67	0,56	0,28	0,39
T8	1,01	1,14	1,02	0,68	0,37
T9	0,65	0,37	0,77	0,53	0,66
Quercetina	0,43	0,63	0,75	0,64	0,27
Monocrotalina	0,82	0,06	0,76	0,21	0,70
Dual Gold	0,19	0,05	0,17	0,05	0,00

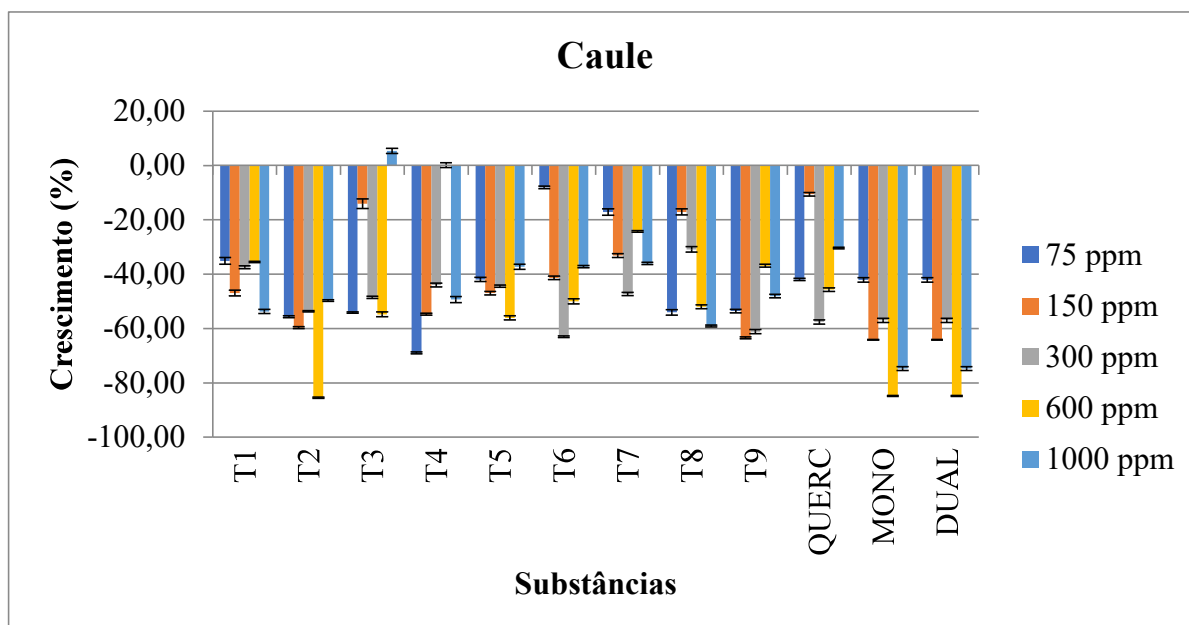


Figura 20. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de braquiária em relação ao controle Dual Gold

2.3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS (1-9) E DAS SUBSTÂNCIAS MONOCROTALINA E QUERCETINA SOBRE O CRESCIMENTO DAS PLÂNTULAS DE PICÃO (*BIDENS PILOSA L.*)

Os resultados presentes na Tabela 14 e na Figura 21, evidenciam que a maioria dos extratos testados apresentou forte capacidade de inibir o crescimento das raízes das plântulas de picão. Os extratos T3, T5 e T8, juntamente com a Monocrotalina, destacaram-se pelo alto potencial herbicida, com efeitos próximos ao Dual Gold utilizado como controle. Além disso, os dados demonstram que todos os extratos e substâncias testadas inibiram o crescimento das raízes das plântulas em diferentes intensidades. Os extratos T3, T5, T7 e T8 se destacaram com os maiores níveis de inibição.

Tabela 22. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-45.27	-52.58	-70.80	-78.35	-56.99
T2	-65.94	-71.27	-61.73	-54.33	-69.15
T3	-76.07	-73.44	-68.54	-68.19	-76.54
T4	-53.80	-61.30	-55.84	-57.72	-48.47
T5	-73.75	-72.71	-71.41	-60.47	-72.84
T6	-59.23	-83.10	-46.40	-45.64	-46.82
T7	-73.24	-76.05	-62.15	-55.45	-38.15
T8	-65.11	-64.93	-74.24	-44.77	-88.78
T9	-58.44	-65.95	-76.14	-67.37	-39.54
Quercetina	-60.30	-67.93	-61.45	-53.15	-35.81
Monocrotalina	-81.91	-53.95	-63.35	-74.33	-64.99
Dual Gold	-69.99	-72.24	-76.88	-77.63	-91.10

O extrato T3 apresentou efeito consistente, especialmente nas concentrações de 75 e 1000 ppm, com inibição de 76,07% e 76,54%, respectivamente. O extrato T5 também mostrou alta atividade nas concentrações de 75 a 300 ppm, com inibição superior a 71%. O extrato T7 teve bons resultados até 300 ppm, mas a inibição caiu para 38,15% em 1000 ppm. Já o extrato T8 apresentou um dos melhores resultados na concentração mais alta, com 88,78%, valor próximo ao do herbicida comercial Dual Gold, que alcançou 91,10% nessa dose.

Entre as substâncias puras, a Monocrotalina apresentou desempenho satisfatório, com destaque para 81,91% a 75 ppm e 74,33% a 600 ppm, embora com variações nas demais concentrações. A Quercetina demonstrou efeito inibitório mais moderado, variando de 35,81% a 67,93%.

Tabela 23. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de picão

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,37	0,46	0,28	0,23	0,46
T2	0,29	0,23	0,52	0,52	0,07
T3	0,28	0,15	0,38	0,34	0,04
T4	0,40	0,64	0,12	0,37	0,58
T5	0,20	0,14	0,21	0,15	0,33
T6	0,93	0,15	0,77	0,95	0,82
T7	0,22	0,16	0,21	0,25	0,27
T8	0,05	0,65	0,16	0,57	0,18
T9	0,63	0,29	0,23	0,21	0,26
Quercetina	0,56	0,10	0,52	0,33	0,08
Monocrotalina	0,13	0,13	0,40	0,24	0,39
Dual Gold	0,08	0,19	0,17	0,24	0,08

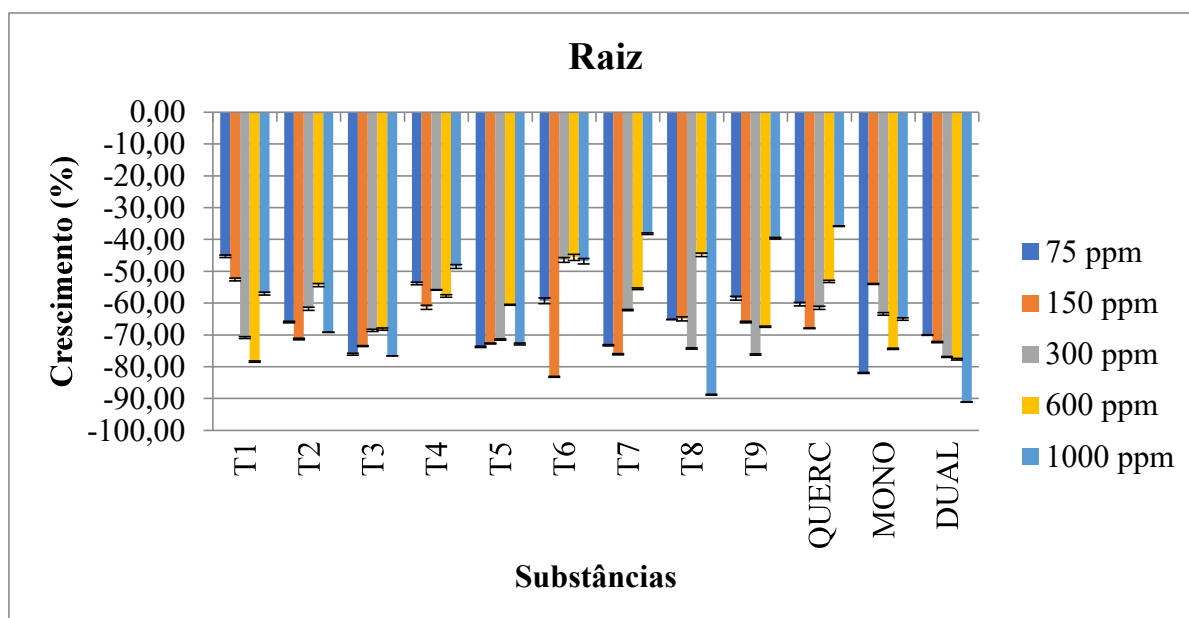


Figura 21. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento radicular das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold

Tabela 24. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	-50.51	-51.76	-69.15	-74.08	-57.31
T2	-54.47	-57.71	-58.80	-45.78	-60.95
T3	-66.29	-68.07	-59.14	-65.20	-71.60
T4	-50.92	-50.53	-41.82	-56.64	-53.87
T5	-55.27	-53.38	-46.91	-47.92	-70.78
T6	-41.55	-75.38	-18.24	-31.31	-18.68
T7	-61.32	-68.80	-65.22	-50.46	-42.29
T8	-59.93	-53.15	-67.63	-47.74	-75.50
T9	-60.52	-76.11	-76.44	-54.33	-53.48
Quercetina	-62.68	-59.69	-77.33	-67.59	-58.93
Monocrotalina	-77.72	-48.69	-64.56	-66.82	-58.05
Dual Gold	-72.67	-87.61	-87.05	-86.77	-95.77

Os resultados indicam que todos os extratos e substâncias testadas apresentaram efeito inibitório sobre a parte aérea das plântulas, com variações entre as concentrações. Entre os extratos, T3, T8, T9 e T7 apresentaram os melhores desempenhos. O extrato T3 teve inibição consistente em todas as concentrações, com destaque para 71,60% a 1000 ppm. O extrato T8 mostrou alta atividade em 300 ppm (67,63%) e 1000 ppm (75,50%). Já o extrato T9 teve forte inibição até 300 ppm, com 76,44%, embora tenha reduzido a eficácia nas doses mais altas. O extrato T7 também apresentou bons resultados até 300 ppm, com inibição acima de 65%.

A substância Monocrotalina foi a mais eficiente em comparação com a Quercetina, alcançando 77,72% de inibição a 75 ppm, embora tenha apresentado variações em outras concentrações. A Quercetina, por outro lado, também apresentou bons resultados, com destaque para 77,33% de inibição a 300 ppm.

Tabela 25. Valores de desvio padrão ($\pm$ DP) obtidos no ensaio biológico sobre o desenvolvimento aéreo das plântulas de picão

Extratos e Substâncias	75 ppm	150 ppm	300 ppm	600 ppm	1000 ppm
T1	0,27	0,73	0,60	0,49	0,36
T2	0,51	0,75	0,24	0,44	0,07
T3	0,45	0,62	0,39	0,84	0,35
T4	0,24	0,85	0,35	0,48	0,30
T5	0,47	0,38	0,90	0,35	0,60
T6	1,63	0,37	1,45	2,97	2,08
T7	0,62	0,50	0,40	0,55	0,14
T8	0,21	1,65	0,14	0,08	0,73
T9	0,71	0,30	0,09	0,70	0,11
Quercetina	0,77	0,35	0,28	0,40	0,31
Monocrotalina	0,33	0,48	0,52	0,82	0,44
Dual Gold	0,35	0,18	0,13	0,31	0,14

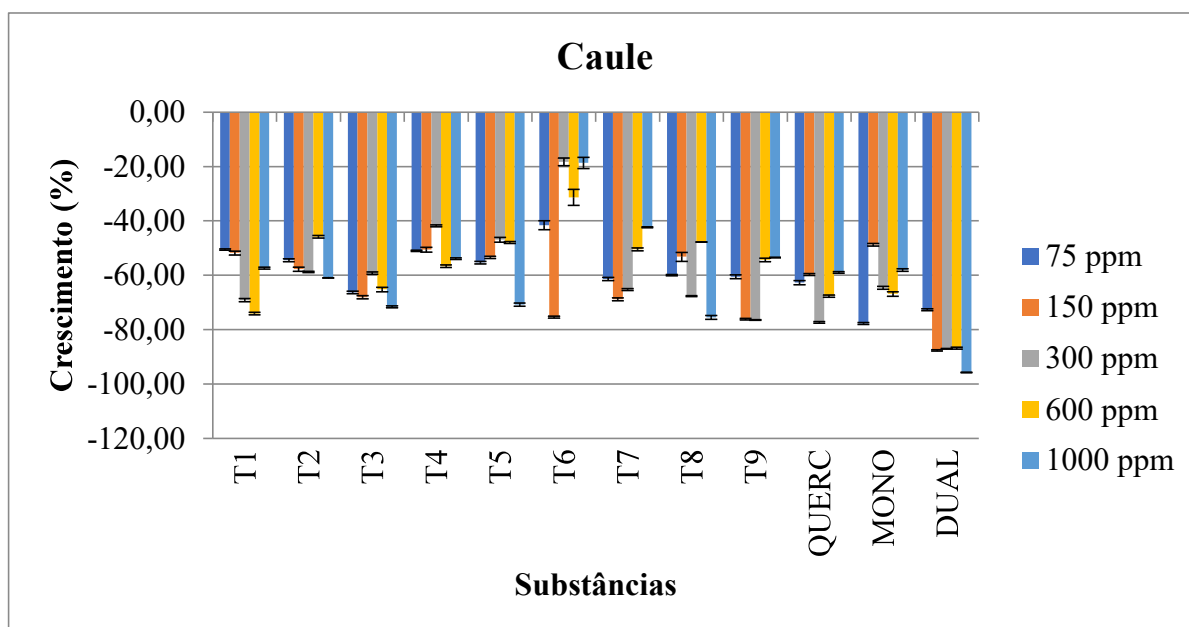


Figura 22. Efeito dos extratos das sementes de *Crotalaria* (1-9) e das substâncias puras, Quercetina e Monocrotalina, sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de picão em relação ao controle Dual Gold

2.4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que todos os extratos testados (T1 a T9), bem como as substâncias isoladas Quercetina e Monocrotalina, influenciaram significativamente no crescimento das plântulas de pepino, tomate, sorgo, braquiária e picão com resultados satisfatórios. A inibição foi observada tanto na parte aérea quanto nas raízes, sendo esta última a mais afetada, o que demonstra que esses compostos têm maior impacto sobre o sistema radicular.

Apesar da inibição observada na parte aérea das plântulas ter sido relativamente baixa para alguns extratos quando comparada com a inibição na raiz, a elevada redução do crescimento radicular compensou essa diferença. Essa ação predominante nas raízes é suficiente para comprometer o desenvolvimento das plântulas, o que confirma o potencial efetivo dos extratos e substâncias testados como herbicidas, sem prejudicar os bons resultados gerais obtidos no experimento.

Entre os extratos avaliados, destacaram-se T2, T3, T5, T8 e T9, que apresentaram os maiores índices de inibição, com desempenho próximo ao herbicida comercial utilizado como controle (Dual Gold).

Quando analisadas as duas substâncias isoladas obtidas comercialmente, Monocrotalina e Quercetina, observamos que o alcaloide Monocrotalina obteve um desempenho maior na inibição das plântulas quando comparada ao flavonoide Quercetina, que apresentou efeito mais moderado, com menor consistência entre as doses, evidenciando que essa classe de compostos possui maior potencial herbicida.

A integração dos resultados químicos e biológicos fornece evidências consistentes de que a atividade herbicida está diretamente associada ao perfil de alcaloides. O extrato T3 (*C. ochroleuca*) destacou-se pela intensa fitotoxicidade contra o sorgo, alcançando 100% de inibição radicular a 1000 ppm. De maneira semelhante, o extrato T2 (fração ácida de *C. ochroleuca*), enriquecido seletivamente em alcaloides segundo a análise química, inibiu em 88,57% o crescimento radicular da braquiária.

Em contraste, o extrato T5 (*C. juncea*), caracterizado por OPLS-DA como rico em globiferina em detrimento da monocrotalina, apresentou efeito consideravelmente menor contra o sorgo, com apenas 49,7% de inibição a 600 ppm. A superioridade da monocrotalina foi confirmada em ensaio isolado, no qual promoveu 93,1% de inibição radicular na braquiária, resultado equivalente ao obtido com o controle comercial Dual Gold®. Essa forte correspondência entre os perfis químicos específicos e os dados quantitativos de inibição

sustenta a conclusão de que os alcaloides pirrolizidínicos são os principais responsáveis pela elevada atividade herbicida observada.

De forma geral, os compostos testados demonstraram eficácia como herbicidas, com resultados promissores para o desenvolvimento de alternativas naturais no controle de plantas daninhas. Não foi possível observar diferença significativa entre a seletividade para as plantas monocotiledôneas e dicotiledônias, mas, essa ausência de seletividade marcante entre espécies também sugere um amplo espectro de ação desses extratos.

Esses dados reforçam o potencial de uso desses compostos como herbicidas naturais, especialmente pelo impacto expressivo no sistema radicular, essencial para o desenvolvimento das plântulas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho utilizou da aplicação de uma abordagem integrada, combinando técnicas de metabolômica com bioensaios de fitotoxicidade, para investigar o potencial herbicida das sementes do gênero *Crotalaria*. A integração entre as análises químicas realizadas no Capítulo 1 e os ensaios biológicos apresentados no Capítulo 2 permitiu não apenas confirmar a atividade herbicida dos extratos, como também correlacioná-la diretamente aos seus perfis químicos específicos.

Além da caracterização química das espécies estudadas, este trabalho estabeleceu as bases de um banco de dados metabolômico robusto, configurando-se como um recurso estratégico para futuras investigações no laboratório. A organização e padronização das informações obtidas por UPLC-QTOF-MSE oferecem uma alternativa superior à análise manual e fragmentada de dados. O repositório desenvolvido possibilita a realização de consultas direcionadas, favorecendo a comparação sistemática de perfis químicos e a identificação ágil de metabólitos em novas amostras.

A análise por UPLC-QTOF-MSE foi fundamental para discriminar metabolicamente as espécies, revelando diferenças marcantes na composição de alcaloides pirrolizidínicos. Observou-se o predomínio de Monocrotalina em *Crotalaria spectabilis* e de Globiferina em *Crotalaria juncea*, compostos que se destacaram como potenciais marcadores químicos associados à atividade biológica. Essa correlação foi corroborada nos bioensaios, nos quais os extratos demonstraram elevada eficácia fitotóxica, principalmente pela inibição significativa do desenvolvimento radicular, sendo esse efeito suficiente para comprometer a sobrevivência das plântulas.

A superioridade da Monocrotalina pura em relação à quercetina na inibição do crescimento vegetal reforça a conclusão de que os alcaloides são os principais responsáveis pela atividade herbicida observada. Com base nesses achados, conclui-se que os extratos das sementes de *Crotalaria*, especialmente os de *C. spectabilis*, constituem uma fonte promissora para o desenvolvimento de herbicidas naturais. A ausência de seletividade acentuada entre monocotiledôneas e dicotiledôneas sugere um espectro de ação amplo, o que pode ser vantajoso para o controle de plantas daninhas em diferentes contextos agrícolas.

Diante dos resultados promissores, diversas perspectivas se abrem para a continuidade e aprofundamento desta linha de pesquisa. Investigações futuras podem concentrar-se no isolamento e na elucidação estrutural de outros metabólitos presentes nos extratos mais ativos. Paralelamente, a compreensão dos mecanismos de ação em níveis fisiológico e bioquímico será

essencial para identificar os alvos celulares específicos da Monocrotalina e de outros compostos fitotóxicos.

Com isso, esse trabalho evidencia o potencial dos compostos naturais presentes nas plantas do gênero *Crotalaria* como base para o desenvolvimento de defensivos agrícolas mais sustentáveis, valorizando a biodiversidade brasileira e abrindo caminho para inovações no controle de plantas daninhas com menor impacto ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARECIDA VERDE DE ANDRADE, D.; APARECIDA ORTOLANI, F.; ROBERTO MORO, J.; VITTI MORO, F. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (**Papilionoideae-Fabaceae**) 1.
- BLANK, D. E. *et al.* Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation of *Crotalaria ochroleuca*: Production of Flavonoids from Hairy Roots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 12, p. 1898–1908, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230083>
- BORGES, W. de S.; BERLINCK, R. G. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química Nova**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>
- CAMARGO, R. B.; BATISTI, D. L. S.; SOUZA, V. K. G. de; NEUMANN, M.; MORITZ, C. M. F. Reflexões sobre a importância do aporte financeiro para a pesquisa científica brasileira com produtos naturais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e43110515001, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.15001>
- CARVALHO, A. M. de; RAMOS, M. L. G.; DA SILVA, V. G.; DE SOUSA, T. R.; MALAQUIAS, J. V.; RIBEIRO, F. P.; DE OLIVEIRA, A. D.; MARCHÃO, R. L.; DA FONSECA, A. C. P.; DANTAS, R. de A. Cover Crops Affect Soil Mineral Nitrogen and N Fertilizer Use Efficiency of Maize No-Tillage System in the Brazilian Cerrado. **Land**, v. 13, n. 5, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/land13050693>
- CHEN, Y.; LI, L.; XU, J.; LIU, Y.; XIE, Y.; XIONG, A.; WANG, Z.; YANG, L. **Mass spectrometric analysis strategies for pyrrolizidine alkaloids**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138748>
- COLEGATE, S. M.; GARDNER, D. R.; JOY, R. J.; BETZ, J. M.; PANTER, K. E. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf205296s>
- DAS CHAGAS, H. S.; GUEDES, R. S.; GASTAUER, M.; RIBEIRO, P. G.; DA SILVA LOBATO, A. K.; CALDEIRA, C. F.; DE ÁVILA, F. W.; DOS REIS, A. R.; RAMOS, S. J. Plant growth and metabolism of exotic and native *Crotalaria* species for mine land rehabilitation in the Amazon. **Journal of Forestry Research**, v. 35, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11676-023-01676-5>
- DE MEDEIROS DA SILVA, C.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. **ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO Senecio** *Quim. Nova*. [S. l.: s. n.].

- DE OLIVEIRA, W. R.; REGO, E. J. L.; VON BUETTNER RISTOW, P. C. L.; DA SILVA VELOZO, E.; DE CARVALHO CARNEIRO, D.; BASTOS, B. L.; DA CUNHA LIMA, S. T. Isolation, characterization and analysis of the agglutinative activity of a lectin from *Crotalaria spectabilis*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 373–381, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13562-018-0446-x>
- DE SOUSA CARVALHO, G.; DOS SANTOS LUIZ, M. M.; INOMOTO, M. M. Black velvet bean, jack bean and showy rattlebox for *Pratylenchus brachyurus* management. **Tropical Plant Pathology**, v. 50, n. 1, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40858-025-00706-3>
- ESPOSITO, M.; CRIMALDI, M.; CIRILLO, V.; SARGHINI, F.; MAGGIO, A. **Drone and sensor technology for sustainable weed management: a review**. [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00217-8>
- FAROOQ, M. A.; ABBASI, A.; NAQQASH, M. N.; ATTA, B.; ARSHAD, M.; FATIMA, M. Evaluation of integrated pest management modulation for mitigation of pesticide residues in mango. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 54, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-40632024v5477681>
- GAO, L.; RUTZ, L.; SCHRENK, D. Structure-dependent hepato-cytotoxic potencies of selected pyrrolizidine alkaloids in primary rat hepatocyte culture. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110923>
- HOLANDA, I. R.; MARTINS, H. L.; MATA, J. F.; KORASAKI, V.; NEPOMUCENO, M. P.; ALVES, P. L. C. A. Role of allelopathic potential of *Crotalaria* spp. L. to control *Panicum maximum* Jacq. weed. **Allelopathy Journal**, v. 62, n. 1, p. 15–30, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2024-62-1-1482>
- HONÓRIO, A. P. *et al.* Extracts from Tissue Cultures of *Crotalaria* spp. as Potential Natural Alternative for Controlling Root-Knot Nematodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 36, n. 5, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20240227>
- HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R. *et al.* **Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*** *Revista Brasileira de Farmacognosia* **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. [S. l.: s. n.].
- KEMPF, M.; REINHARD, A.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of pa levels in food and animal feed required. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 1, p. 158–168, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900529>

- KUSAR, S.; SADDIQUE, Z.; ALI, F.; BASHIR, S.; ZUBAIRI, T. GCMS and HPLC profiling, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Crotalaria medicaginea* Lamk. **South African Journal of Botany**, v. 168, p. 196–208, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.03.014>
- LEI, M.; WANG, L.; OLATUNDE, O. O.; SINGH, S.; OVATLARNPORN, C.; BASIT, A.; OLATUNJI, O. J. UPLC–ESI–QTOF–MS profiling, antioxidant, antidiabetic, antibacterial, anti-inflammatory, antiproliferative activities and in silico molecular docking analysis of *Barleria strigosa*. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 10, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00451-2>
- MAREGESI, S. M.; NGASSAPA, O. D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 457–470, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.006>
- MATOS, D. F.; ALVES, M. C. S.; RUZENE, D. S.; BATISTA, M. V. de A.; SILVA, D. P. BIOINFORMÁTICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS ÔMICAS: UMA BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. In: **Tecnologia e Inovação na Agricultura: aplicação, produtividade e sustentabilidade em pesquisa**. [S. l.]: Editora Científica Digital, 2023. p. 23–43. Disponível em: <https://doi.org/10.37885/230312569>
- MEDEIROS, V.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, J. M.; FLÁVIO, A.; DANTAS, M.; MACEDO, I.; SILVA, J. Intoxicação Intoxicação (F abaceae) em Equídeos no Paraíba semi-árido da P. v. 24, n. 3, p. 132–143, 2004.
- MORAIS, S. M. de; VIEIRA, Í. G. P. **Introdução à Prospecção de Produtos Naturais**. [S. l.]: Editora Poisson, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.36229/978-65-5866-110-8>
- OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; BARBOSA, L. C. A.; DE MELO SILVA, T. A novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by NMR and DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, p. 337–343, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.065>
- ORŠOLIĆ, D.; PEHAR, V.; ŠMUC, T.; STEPANIĆ, V. Comprehensive machine learning based study of the chemical space of herbicides. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90690-w>
- PACHECO, J. S. * S.-L. R. E. S. **Estado da Arte / State of the Art** *Revista Fitos*. [S. l.: s. n.].
- PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; NETO, F. C.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Plant

- metabolomics: Methods and challenges. **Quimica Nova**, v. 43, n. 3, p. 329–354, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>
- PRABHAKAR, G.; SWETHA, K.; RASOOL, A.; KRISMASTUTI, F. S. H. In vitro biological evaluation of Steroidal Saponins from seeds of *Crotalaria verrucosa* L. for cancer studies. **Environmental Advances**, v. 15, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100471>
- PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; REILLY, P. E. B.; SEAWRIGHT, A. A. **Pyrrolizidine alkaloids in human diet** *Mutation Research*. [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.elsevier.com/locate/jtoxcom Community address: www.elsevier.com/locate/mutres.
- QUEIROZ, G. R.; DE CÁSSIA LIMA RIBEIRO, R.; DA COSTA FLAIBAN, K. K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LISBÔA, J. A. N. Intoxicação espontânea por *Crotalaria incana* em bovinos no norte do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 823–832, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p823>
- RECH, C.; RIBEIRO, L. P.; BENTO, J. M. S.; POTT, C. A.; NARDI, C. Monocrotaline presence in the *Crotalaria* (Fabaceae) plant genus and its influence on arthropods in agroecosystems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256916>
- RECH, C.; RIBEIRO, L. P.; BENTO, J. M. S.; POTT, C. A.; NARDI, C. Monocrotaline presence in the *Crotalaria* (Fabaceae) plant genus and its influence on arthropods in agroecosystems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256916>
- SALOMON, R. M.; ALVES DE ASSIS, R. M.; MIRANDA ROCHA, J. P.; FERREIRA LEITE, J. J.; MIRANDA, T. F.; PEREIRA DOS SANTOS, J.; FERREIRA DE ANDRADE, L. I.; BRASIL PEREIRA PINTO, J. E.; KELLY VILELA BERTOLUCCI, S. Enhancing sustainable sweet grass (*Lippia dulcis* L.) productivity and essential oil content using sunn hemp (*Crotalaria juncea* L.) as green manure. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 66, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103593>
- SAMPAIO, R. M.; FREDO, C. E.; DA COSTA, A. R.; BORTOLOTTI, G. Phytosanitary technologies: a study of Integrated Pest Management (IPM) in São Paulo's orange production, LUPA 2016/2017. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 61, n. 3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9479.2022.258289>
- SCHRAMM, S.; KÖHLER, N.; ROZHON, W. **Pyrrolizidine alkaloids: Biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants**. [S. l.]: MDPI AG, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24030498>

- SCHRENK, D. **Toxicology of pyrrolizidine alkaloids**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110938>
- SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C.; CODREANU, S. G.; SHERROD, S. D.; MCLEAN, J. A. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1897–1905, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- SCOTT CHIALVO, C. H.; CHIALVO, P.; HOLLAND, J. D.; ANDERSON, T. J.; BREINHOLT, J. W.; KAWAHARA, A. Y.; ZHOU, X.; LIU, S.; ZASPEL, J. M. A phylogenomic analysis of lichen-feeding tiger moths uncovers evolutionary origins of host chemical sequestration. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 121, p. 23–34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.12.015>
- SCUPINARI, T.; MANNOCHIO-RUSSO, H.; MARCHEAFAVE, G. G.; DA SILVA BOLZANI, V.; DE OLIVEIRA NUNES, E.; DIAS, W. P.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ZERAIK, M. L. Effects of *Crotalaria spectabilis* extract in *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* soybean nematodes. **European Journal of Plant Pathology**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02821-4>
- SHI, R.; WEI, Z.; ZHU, D.; FU, N.; WANG, C.; YIN, S.; LIANG, Y.; XING, J.; WANG, X.; WANG, Y. Baicalein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting vascular remodeling in rats. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, p. 124–135, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2017.11.003>
- SIPPEL, W. L. **CROTALARIA POISONING IN LIVESTOCK AND POULTRY**. [S. l.: s. n.].
- SOTO-ESTRADA, C.; CRUZ-DURÁN, R. *Crotalaria heteromorpha* (Leguminosae, Papilionoideae), a new species of the trifoliolate crotalarias group from the state of Guerrero, Mexico. **Brittonia**, v. 75, n. 3, p. 240–248, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12228-023-09751-1>
- SUBAEDAH, S.; ALADIN, A.; NIRWANA. Fertilization of Nitrogen, Phosphor and Application of Green Manure of *Crotalaria Juncea* in Increasing Yield of Maize in Marginal Dry Land. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 20–25, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.114>
- SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>

- SUN, S.; LIU, M.; HE, J.; LI, K.; ZHANG, X.; YIN, G. Identification and determination of seven phenolic acids in brazilian green propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. **Molecules**, v. 24, n. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24091791>
- TZE TAK, S.; ZAMAKSHSHARI, H.; FHAIZAL, M.; BUKHORI, M.; MADIAHLAGAN, E.; WAHI, R.; ANCHAH, L. **Acidified water extraction increases carpaine yield from *Carica papaya* L. LeafAsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.** [*S. l.: s. n.*].
- WILLIAMS, M. C.; MOLYNEUX, R. J. Occurrence, Concentration, and Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids in Crotalaria Seeds . **Weed Science**, v. 35, n. 4, p. 476–481, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0043174500060410>
- WINK, M. **Quinolizidine and Pyrrolizidine Alkaloid Chemical Ecology – a Mini-Review on Their Similarities and Differences.** [*S. l.*]: Springer New York LLC, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1005-6>
- XIA, Q.; HE, X.; SHI, Q.; LIN, G.; FU, P. P. Quantitation of DNA reactive pyrrolic metabolites of senecionine – A carcinogenic pyrrolizidine alkaloid by LC/MS/MS analysis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, n. 1, p. 167–174, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.12.001>
- YANG, N.; WANG, H.; LIN, H.; LIU, J.; ZHOU, B.; CHEN, X.; WANG, C.; LIU, J.; LI, P. Comprehensive metabolomics analysis based on UPLC-Q/TOF-MSE and the anti-COPD effect of different parts of: *Celastrus orbiculatus* Thunb. **RSC Advances**, v. 10, n. 14, p. 8396–8420, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9ra09965d>
- ZHANG, X.; CHOI, F. F. K.; ZHOU, Y.; LEUNG, F. P.; TAN, S.; LIN, S.; XU, H.; JIA, W.; SUNG, J. J. Y.; CAI, Z.; BIAN, Z. Metabolite profiling of plasma and urine from rats with TNBS-induced acute colitis using UPLC-ESI-QTOF-MS-based metabonomics - A pilot study. **FEBS Journal**, v. 279, n. 13, p. 2322–2338, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08612.x>