

JILMA LUZIA BATALHA ROSA DIAS DE CARVALHO

**CULTIVO TRADICIONAL E *IN VITRO* DE *Crotalaria retusa* PARA ISOLAMENTO,
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS**

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

Orientador: Antonio Jacinto Demuner

Coorientador: Elson Santiago de Alvarenga

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

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

T

C331c
2020

Carvalho, Jilma Luzia Batalha Rosa Dias de, 1992-
Cultivo tradicional e *in vitro* de *Crotalaria retusa* para
isolamento, identificação e quantificação de alcaloides
pirrolizidínicos / Jilma Luzia Batalha Rosa Dias de Carvalho. –
Viçosa, MG, 2020.

54 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antonio Jacinto Demuner..

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-54.

1. Cromatografia líquida. 2. Espectrometria de massa.
3. Flavonóides. 4. Alcalóides de pirrolizidina. 5. *Crotalaria
retusa*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Química. Programa de Pós-Graduação em Química. II. Título.

CDD 22. ed. 543.84

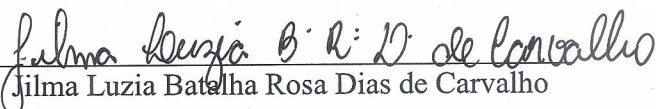
JILMA LUZIA BATALHA ROSA DIAS DE CARVALHO


**CULTIVO TRADICIONAL E *IN VITRO* DE *Crotalaria retusa* PARA ISOLAMENTO,
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS**

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

APROVADA: 27 de novembro de 2020

Assentimento:


Jilma Luzia Batalha Rosa Dias de Carvalho
Autora


Antonio Jacinto Demuner
Orientador

Para meu amado filho Guilherme, o
responsável por dar sentido e alegria
à minha vida.
É por ele que nunca desisti.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que sempre me guiou e iluminou meus passos durante todos esses anos.

Aos meus pais, irmãs, enteados e ao meu marido Fernando, que além de me amarem muito, sempre me deram força e incentivo, para nunca desistir, sendo minha verdadeira rede de apoio em tudo e principalmente na criação do Guilherme nesse período.

À Universidade federal de Viçosa, ao departamento de química e ao laboratório de análise e síntese de agroquímicos (LASA), pela oportunidade de realizar meu trabalho.

Ao meu orientador Demuner, pelos ensinamentos, confiança e apoio ao longo desses dois anos.

Aos estagiários Maria e Gustavo, que foram essenciais para a realização dessa pesquisa.

Às alunas de doutorado do LASA Gabriela e Anni, pelos ensinamentos, amizade e contribuições durante o trabalho, que me acolheram desde o primeiro dia de laboratório e foram muito importantes em cada etapa concluída nesses dois anos.

Aos professores participantes da banca de avaliação, por terem aceitado o convite de participar da minha avaliação.

Aos técnicos da UFV, que me auxiliaram nos experimentos e testes realizados.

Aos colegas do LASA, pelo companheirismo e por toda ajuda durante o tempo que passei no laboratório.

Ao meu grande amigo Vinicius, que me ensinou muita coisa no laboratório, pelas conversas de apoio, amizade e por estar sempre comigo mesmo estando longe.

Aos amigos que são e aos que não são da UFV, que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse esse trabalho, seja com uma palavra amiga, com o trabalho em si, ou como rede de apoio para o Guilherme.

E por fim, ao meu filho Guilherme, que apesar das minhas grandes ausências sempre me amou incondicionalmente, foi motivo de força e alegria desde o dia que chegou em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

CARVALHO, Jilma Luzia Batalha Rosa Dias de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2020. **Cultivo tradicional e *in vitro* de *Crotalaria retusa* para isolamento, identificação e quantificação de alcaloides pirrolizidínicos.** Orientador: Antonio Jacinto Demuner. Coorientador: Elson Santiago de Alvarenga

Plantas do gênero *Crotalaria* possuem um crescimento rápido e se adaptam bem ao clima tropical, sendo de fácil cultivo. Dentre as Crotalárias destacam-se a *Crotalaria retusa*, *C. juncea*, *C. spectabilis* e *C. ochroleuca*. São plantas muito úteis para no controle de insetos, larvas e nematoides no solo, além do uso como adubo verde no sistema de rotação de culturas e proteção do solo. Tais habilidades estão ligadas ao fato dessas plantas serem capazes de biossintetizar alcaloides pirrolizidínicos como metabólitos secundários. O principal alcaloide isolado e estudado até hoje em espécies desse gênero é a monocrotalina. É muito tóxico e pode causar complicações hepatotóxicas graves em animais vertebrados. Sendo assim, o estudo dessas plantas e dos alcaloides que elas produzem é muito importante do ponto de vista agrícola e econômico. Com o objetivo de aumentar a produção do teor destes alcaloides foi realizado, neste trabalho, o cultivo *in vitro* em comparação com o convencional. Assim, o cultivo *in vitro* foi desenvolvido com sementes de *C. juncea* e *C. ochroleuca*. Já o cultivo convencional foi realizado em casa de vegetação, sendo utilizadas as folhas de *Crotalaria retusa* para extração. Os extratos obtidos foram analisados por infravermelho, RMN e UPLC-QTOF-MS. Os dados gerados foram processados no software MassLynx versão 4.1 e tiveram todas as suas fórmulas moleculares possíveis deduzidas a partir da massa exata de cada componente. Os perfis químicos dos extratos foram estabelecidos analisando os cromatogramas em conjunto com os espectros de massa no modo de ionização positiva (ESI+), baseando-se em relatos de metabólitos já descritos na mesma família, gênero e espécie. Com este método foi possível a identificação de dez metabólitos sendo sete alcaloides pirrolizidínicos, três flavonoides e um composto isolado. Os resultados do presente estudo mostraram a eficiência da técnica de infravermelho, RMN e UPLC-QTOF-MS para identificação química dos constituintes dos extratos da *Crotalaria retusa*, respaldando a realização de ensaios biológicos com os referidos extratos e compostos isolados.

Palavras-chave: *Crotalaria retusa*. Alcaloide pirrolizidínico. Cultura *in vitro*. LC-MS. Flavonoides.

ABSTRACT

CARVALHO, Jilma Luzia Batalha Rosa Dias de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2020. **Traditional and *in vitro* cultivation of *Crotalaria retusa* for isolation, identification and quantification of pyrrolizidine alkaloids.** Adviser: Antonio Jacinto Demuner. Co-adviser: Elson Santiago de Alvarenga

Plants of the genus *Crotalaria* have a fast growth and adapt well to the tropical climate, being easy to grow. Among the *Crotalaria*s, *Crotalaria retusa*, *C. juncea*, *C. spectabilis* and *C. ochroleuca* stand out. They are very useful plants for controlling insects, larvae and nematodes in the soil, in addition to being used as green manure in the crop rotation system and soil protection. Such abilities are linked to the fact that these plants are able to biosynthesize pyrrolizidine alkaloids as secondary metabolites. These alkaloids are heterocyclic, nitrogenous compounds that behave as bases and can be found in any part of the plant performing various functions in it. The main alkaloid isolated and studied to date in species of this genus is monocrotaline, an extremely toxic alkaloid that can cause severe hepatotoxic complications in vertebrate animals. Therefore, the study of these plants and the alkaloids they produce is very important from an agricultural and economic point of view. In order to increase the production of the content of these alkaloids, *in vitro* cultivation was performed in comparison with the conventional one. Thus, *in vitro* culture was developed in the tissue culture laboratory, where seeds of *C. juncea* and *C. ochroleuca* were used. Conventional cultivation was carried out in a greenhouse, using *Crotalaria retusa* leaves for extraction. The extracts obtained were analyzed by infrared, NMR and UPLC-QTOF-MS. The generated data were processed in MassLynx software version 4.1 and had all their possible molecular formulas deduced from the exact mass of each component. The chemical profiles of the extracts were established by analyzing the chromatograms together with the mass spectra in the positive ionization mode (ESI +), based on reports of metabolites already described in the same family, genus and species. With this method it was possible to identify ten metabolites, seven pyrrolizidine alkaloids, three flavonoids and an isolated compound. The results of the present study showed the efficiency of the infrared, NMR and UPLC-QTOF-MS technique for chemical identification of *Crotalaria retusa* extracts, supporting the performance of biological tests with the said extracts and isolated compounds.

Keywords: *Crotalaria retusa*. Pyrrolizidine alkaloid. *In vitro* culture. LC-MS. Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica de uma necina	12
Figura 2: Estrutura das bases retronecina, otonecina e platenecina.....	12
Figura 3: Estrutura da etilcrotalina.....	14
Figura 4: Plantio de <i>Crotalaria</i>	15
Figura 5: Fórmula estrutural da monocrotalina.....	16
Figura 6: Plantio em vaso de <i>C. retusa</i>	22
Figura 7: Placa de CCD com reagente de Dragendorff.....	23
Figura 8: Fluxograma da obtenção do extrato alcaloídico.....	24
Figura 9: Espectro no IV do extrato etanólico bruto.....	29
Figura 10: Espectro no IV do extrato alcaloídico.....	29
Figura 11: Cromatograma obtido a partir da injeção de extrato etanólico bruto	31
Figura 12: Cromatograma obtido a partir a injeção de extrato alcaloídico.....	32
Figura 13: Retrorsina, senensionina, integerrimina, usaramina, retrorsina <i>N</i> -óxido, senencionina <i>N</i> -óxido e integerrimina <i>N</i> -óxido....	33
Figura 14: Isokaempferida, nobiletina e sinensetina.....	34
Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra JC3.....	35
Figura 16: Multipleteo relacionado a H7.....	35
Figura 17: Duplo Dupleteo relacionado a H9a e H9b.....	36
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra JC3*.....	37
Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra JC3*	40
Figura 20: Experimento DEPT da amostra JC3* (^1H a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz)	42
Figura 21: Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. retusa</i>	43
Figura 22: Mortalidade dos nematoides em porcentagem.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais bandas de espectro no IV do extrato etanólico bruto.....	30
Tabela 2: Principais bandas de espectro no IV do extrato alcaloídico.....	30
Tabela 3: Compostos químicos identificados nos extratos de <i>C. retusa</i> utilizando a técnica de UPLC-QTOF-MSE.....	33
Tabela 4: Atribuições dos hidrogênios da molécula do alcaloide pirrolizidínico.....	38
Tabela 5: Atribuições dos átomos de carbono da molécula do alcaloide pirrolizidínico.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	Alcaloides Pirrolizidínicos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	CORrelation SpectroscopY (Espectroscopia de correlação)
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
°GL	Grau Gay Lussac
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento escalar
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
m	Multipleto
MHz	MegaHertz
Rf	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
tr	Tempo de retenção
ppm	Partes por milhão
δ	Deslocamento químico em RMN
IV	Infravermelho
ATR	Reflectância total atenuada
CRB	Extrato etanólico bruto
CRA	Extrato alcaloídico não purificado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Alcaloides	11
1.2 Alcaloides pirrolizidínicos.....	11
1.3 O Gênero <i>Crotalaria</i>	14
1.4 Monocrotalina.....	16
1.5 Cultivo <i>in vitro</i> : Importância para produção de metabólitos secundários	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Material vegetal cultivado em vaso.....	22
4.2 Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>C. retusa</i>	22
4.3 Extração ácido-Base	22
4.4 Análise em infravermelho	24
4.5 Análise em LC-MS	25
4.6 Purificação do extrato alcaloídico	25
4.7 Cultivo <i>in vitro</i>	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.2 Análise em infravermelho	29
5.2 Análise em LC-MS	31
5.3 Purificação do extrato alcaloídico	34
5.3.1 Separação em coluna cromatográfica	34
5.3.2 Isolamento utilizando HPLC	34
5.4 Cultivo <i>in vitro</i>	43
6 CONCLUSÃO.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alcaloides

Alcaloide são compostos com muita variedade estrutural que fazem parte da constituição de muitos grupos de metabólitos secundários das plantas, podendo ser usados como mecanismos de defesa das mesmas (ZIEGLER & FACCHINI, 2008). Os alcaloides desempenham um importante papel em vários setores como economia e medicina e podem ser usados como medicamentos ou venenos (DEY *et al.*, 2020; JANK e RATH, 2017; WANG *et al.*, 2012).

O primeiro alcaloide isolado foi a morfina em 1805 por Freidrich Wilhelm Adam Serturner (1783-1841), quando ele realizava experimentos para estudar o princípio ativo e as propriedades do ópio. Ao isolar o alcaloide ele percebeu que sem ele o ópio perdia o efeito e por sua vez o princípio ativo sozinho era mais forte que o ópio processado. A esse princípio ativo ele deu o nome de morfina em homenagem a Morfeu, deus grego dos sonhos, uma referencia aos efeitos da substância (DUARTE, 2005).

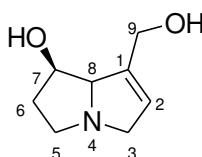
Essa descoberta deu origem a novos estudos dentro da química e muitos outros alcaloides foram e ainda são isolados, a fim de se estudar as suas propriedades terapêuticas e econômicas.

Os alcaloides são substancias nitrogenadas naturais, caracterizadas pela presença de um nitrogênio heterocíclico, com ação farmacológica e tem em comum o fato de se comportarem como base.

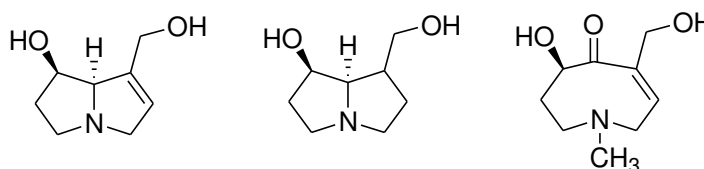
Eles podem ser encontrados em todas as partes das plantas, podendo ou não se acumular em maior quantidade em alguns órgãos específicos e desempenham diferentes funções sendo a mais comum a atuação no sistema de defesa das plantas.

1.2 Alcaloides pirrolizidínicos

Alcaloides pirrolizidínicos (AP) são ésteres de aminoálcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos), que podem ocorrer na forma de mono e diésteres cíclicos. As necinas caracterizam-se por apresentarem um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como "cabeça de ponte", um grupamento hidroximetila em C1 e uma hidroxila em C7 (SILVA *et al.*, 2006).

Figura 1: Estrutura básica de uma necina**Fonte:** Autor

A união entre um núcleo pirrolizidínico necina e ácidos alifáticos pode resultar na formação de monoésteres e diésteres de três tipos de bases necinas: retronecina, otonecina e platinecina (ZHU *et al.*, 2018) (Figura 2).

Figura 2: Estruturas das bases retronecina, platinecina e otonecina**Fonte:** Autor

A base necina difere no grau de hidroxilação, estereoquímica, substituintes e no grau de insaturação do anel (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A base estrutural de um alcaloide pirrolizidínico tem origem a partir de duas moléculas de ornitina pelo intermediário putrescina. Duas moléculas de putrescina sofrem uma condensação dependente do NAD⁺ por uma reação de desaminação oxidativa para formar a imina, convertida em homospermidina pela redução por NADH. A biossíntese de uma estrutura típica e simples de pirrolizidina natural como a retronecina, que pode ser derivada do aldeído correspondente por etapas envolvendo oxidação e redução (DEWICK, 2002).

Os alcalóides pirrolizidínicos (AP), são fitoquímicos de ocorrência natural com cerca de 700 substâncias já relatadas na literatura (ROBINS, 1989; DAMOUR *et al.*, 2020). Estima-se que mais de 6000 espécies contenham AP, o que corresponde a 3% das angiospermas. Estes metabólitos ocorrem principalmente em plantas do gênero *Senecio* (Compositae), *Crotalaria* (Leguminosae) e *Heliotropium* (Boraginaceae) (ROBINS, 1989; ROBERTSON E STEVENS, 2017; ROCKINGER *et al.*, 2017).

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 (MEAGHER *et al.*, 2019). Existem descrições do uso das espécies *C. spectabilis* e *C. juncea* em pequenas comunidades da América do Sul e na Índia, para tratar diversas doenças de pele como sarna, impetigo e psoríase (MAREGESI *et al.*, 2007).

Há também relatos de que a espécie *C. retusa* tenha sido utilizada para tratar infecções epidérmicas e sapinhos; as raízes foram usadas contra hemoptise; as folhas e as flores contra febre, resfriados e doenças pulmonares; sementes contra a hanseníase, flatulência, febre e como analgésico contra picadas de escorpião (SUT *et al.*, 2020).

Adicionalmente, os alcaloides pirrolizidínicos (AP) demonstraram expressivos efeitos nematicidas, ovicidas e repelentes de diferentes parasitas de plantas e nematoides de vida livre, contudo os efeitos foram mais pronunciados para os AP terciários do que para os oxidados, representando assim importantes candidatos para novas estratégias de manejo contra os nematoides de solo (THODEM *et al.*, 2009; SUBAEDAH *et al.*, 2016).

Plantas contendo AP são muito utilizadas com propósitos medicinais, pois eles despertam um grande interesse de estudiosos por possuírem em sua maioria uma alta toxicidade, como no caso da monocrotalina, alcaloide presente na planta de gênero *Crotalaria* (SINAN *et al.*, 2020; GEBUREK *et al.*, 2019).

Essa toxicidade pode levar a vários efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos sendo relatados diversos exemplos de contaminação ao longo da história (HONORIO JUNIOR *et al.*, 2010; SCHRAMM *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2020; SCHRENK, 2020).

Os AP 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 com base necina esterificada com um ou mais ácidos nécicos (PACHECO *et al.*, 2010)

Muitos AP causam sérias doenças em animais domésticos e humanos (FLETCHER *et al.*, 2009). Do ponto de vista toxicológico, duas classificações de AP são importantes: os saturados na base necina, que não são tóxicos e utilizados na medicina popular, como os AP

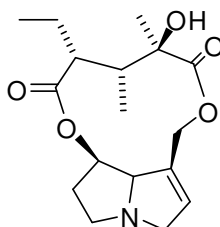
da *Arnica montana*, e os insaturados na base necina que são hepatotóxicos, genotóxicos e pneumotóxicos (THODEM *et al.*, 2009).

Entretanto, sabe-se que não são todos os alcaloides que desencadeiam o mecanismo de toxicidade acima mencionado. Para que tal processo ocorra é essencial a presença de uma insaturação entre os carbonos 1 e 2. Logo, as bases necinas saturadas são atóxicas a exemplo dos alcaloides pirrolizidínicos da *Arnica montana* utilizada na medicina popular.

Atualmente na literatura estima-se que existam cerca de 660 alcaloides pirrolizidínicos (AP) elucidados (HE *et al.*, 2017). Esses metabólitos secundários estão presentes em mais de 6000 espécies de plantas (ZHU *et al.*, 2018), conferindo-as elevada toxicidade a animais e humanos (HE *et al.*, 2017). O contato com esses alcaloides se dá em decorrência da alimentação de animais intoxicados ou através da utilização de plantas medicinais (AHMAD *et al.*, 2018).

Além disso, foram realizados trabalhos de identificação da monocrotalina isolada de *Crotalaria paulina* por espectroscopia no infravermelho e Raman (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Dessa mesma espécie foi isolado um novo alcaloide, denominado de etilcrotalina (OLIVEIRA *et al.*, 2018) (Figura 3)

Figura 3: Estrutura da etilcrotalina



Fonte: autor

1.3 O Gênero *Crotalaria*

O nome *crotalaria* refere-se ao chocalho das vagens secas dessas plantas, semelhante ao da cobra cascavel (*Crotalus sp.*). Esse nome foi dado ao gênero dessas plantas porque suas vagens secas com as sementes, quando sacudidas ou expostas ao vento, produzem um som que se assemelha ao que é emitido pelo guizo desses répteis (MARTINEZ *et al.*, 2013). As *crotalarias* são plantas do tipo leguminosas e possuem um crescimento acelerado. As folhas são simples, alternadas, lanceoladas com a superfície ligeiramente pilosa, o caule é glabro, as flores geralmente são amarelas, às vezes estriadas com vermelho, dispostas em ráceros vistosos, com cálice maior que a corola, as vagens são cilíndricas de 4 a 6 cm de comprimento

e se propaga por sementes, as quais apresentam variação na cor do tegumento (ANDRADE *et al.*, 2008) (Figura 4).

Figura 4: Plantio de *Crotalaria*



Fonte: Autor

Todas as espécies do gênero *Crotalaria* podem ser cultivadas no Brasil por ser de fácil cultivo e se adaptarem bem ao clima. Além disso, elas possuem diversas aplicações, podendo ser usadas como adubo verde na rotação de culturas com o objetivo de melhorar as condições do solo, diminuindo a erosão, reduzindo nematoide e inibindo o crescimento de insetos e larvas (SUBAEDAH *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SCHRAMM *et al.*, 2019; TIMLER *et al.*, 2020).

As espécies de *Crotalaria* possuem muitas aplicações na agricultura, assim como também na medicina por possuir propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias e hepatotóxicas, o que faz com que desperte o interesse de diversos grupos de estudos (XIE *et al.*, 2017; XIA *et al.*, 2020).

O gênero *Crotalaria* possui uma grande variedade de espécies, sendo que as espécies *Crotalaria retusa*, *Crotalaria ochroleuca*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis* foram os objetos de estudo desse trabalho. As espécies de *Crotalaria*, em sua maioria, são capazes de biossintetizar a monocrotalina e outros que ainda são elementos de muitos estudos.

Hoje as espécies tóxicas descritas na literatura são a *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria cripata*, *Crotalaria retusa*, *Crotalaria dura* e *Crotalaria globifera* (SCHRAMM *et al.*, 2019).

Além de suas aplicações na agricultura, podem ser utilizadas na medicina popular com atividades farmacológicas atuando como antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antidiabetes, hepatotóxica e repelente (ARAGÃO *et al.*, 2017). A espécie *Crotalaria sessiliflora* L. já é utilizada na cultura chinesa como termogênico, anti-hipertensivo, remoção de toxinas do corpo e no combate ao câncer de pele, cervical e do esôfago. Por esses motivos, aumentam-se os estudos na área medicinal referentes a estas plantas para o controle principalmente do câncer e a busca da beleza corporal (XI *et al.*, 2017).

Existem descrições do uso das espécies *C. spectabilis* e *C. juncea* em pequenas comunidades da América do Sul e na Índia, para tratar diversas doenças de pele como sarna, impetigo e psoríase (MAREGESI *et al.*, 2007).

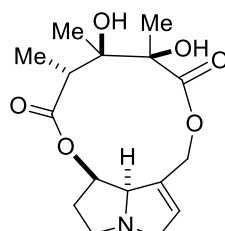
A toxicidade das espécies de *Crotalaria* deve-se à presença de alcaloides pirrolizidínicos (NOBRE *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2020; SCHRENK, 2020), uma vez que estes em sua maioria são carcinogênicos para animais e humanos. Estudos apontam que após a ingestão da planta e absorção intestinal de suas moléculas, ao serem metabolizadas no fígado e convertidas em eletrófilos muito reativos, capazes de reagir com macromoléculas celulares formando adutos com DNA e dando assim início à ação tóxica aguda ou crônica e causando efeitos mutagênicos no sistema microssomal de mamíferos (KEMPF *et al.*, 2010).

No Brasil existem vários relatos de animais que sofreram intoxicação por ingestão natural dessas plantas devido a épocas de escassez de alimento e grande oferta de *Crotalaria* como espécie invasora dos pastos (QUEIROZ *et al.*, 2013).

1.4 Monocrotalina

O gênero *Crotalaria* biossintetiza o alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (Figura 5), sendo considerado como um dos inibidores do movimento de juvenis de *M. incognita* (CHITWOOD, 2002), podendo ser este composto o responsável pela atividade nematicida.

Figura 5: Fórmula estrutural da monocrotalina



Fonte: autor

A monocrotalina é altamente tóxica para vertebrados como: bovinos, suínos, ovinos, equinos, entre outros, ocorrendo alguns casos de intoxicação no Brasil. No Estado da Paraíba cavalos apresentavam sinais clínicos de encefalopatia hepática, andar compulsivo e descontrolado e perda de peso. Analisando a região de intoxicação dos animais foi verificada uma grande quantidade de *C. retusa* que foi atribuída a estas plantas na alimentação dos animais a sua intoxicação (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Devido à alta concentração de monocrotalina na *C. retusa*, buscou-se avaliar sua atividade perante o gênero *Leishmania spp* causador da Leishmaniose, uma doença com grande evidência nos países subdesenvolvidos. Os testes realizados comprovaram a intoxicação causada nas células desse parasita, para que pudesse obter um controle eficaz do mesmo (ROCHA *et al.*, 2009).

A monocrotalina foi o primeiro alcaloide a ser isolado do gênero *Crotalaria*. A determinação estrutural da porção necina representada pela base nitrogenada retronecina, comum a muitos alcaloides pirrolizidínicos, antecedeu a porção do ácido nécico, chamado ácido monocrotálico, que liga os anéis A e B da retronecina formando os ésteres ou bislactonas (MARTINEZ *et al.*, 2013).

Esse alcaloide já foi isolado de mais de uma espécie de *Crotalaria* e, além de seu efeito hepatotóxico, outros efeitos como pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, teratogênicos e carcinogênicos já foram identificados como consequências da sua toxicidade (ANDRADE *et al.*, 2010; HONORIO JUNIOR *et al.*, 2010; SCHRAMM *et al.*, 2019; OKETCH-RABAH *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020; SCHRENK, 2020).

1.5 Cultivo *in vitro*: Importância para produção de metabólitos secundários

O cultivo *in vitro* de tecido e órgão tem sido uma alternativa sustentável para o cultivo de plantas em larga escala, dentro de curto período e sob condições físicas e químicas monitoradas para obter plantas mais resistentes, produtivas, aromáticas ou até mesmo coloridas (CARVALHO *et al.*, 2011; JEZIOREK *et al.*, 2019).

Esses processos biotecnológicos, além da conservação dos recursos naturais, também apresentam importância na aceleração dos programas de melhoramento genético de plantas, na tecnologia da recombinação gênica, para produzir raízes transgênicas com potencial de produção de metabólitos secundários em sistema fechado com alto valor agregado de interesse farmacológico, terapêutico e agrônômico (GELVIN, 2009; THIYAGARAJAN e VENKATACHALAM, 2012; GEORGIEV *et al.*, 2012; NESTER, 2015; GAI *et al.*, 2015).

Estudos relatam que as culturas de raízes transgênicas apresentam crescimento superior àquelas observadas em raízes não transformadas. Além disso, possibilita a produção de tipos específicos de determinado metabólito secundário (FILOVÁ, 2014; HÄKKINEN *et al.*, 2016; MEDINA-BOLIVAR e YANG, 2017).

Outro fator interessante é que essas raízes transgênicas obtidas a partir de matrizes elites, e as culturas de suspensões de células em frascos, têm sido escalonadas para a produção em biorreatores, com aumento em produtividade de metabólitos secundários de relevância industrial, compostos bioativos que muitas vezes são difíceis de ser sintetizados em laboratório (LEHMANN *et al.*, 2014).

Várias plantas são pesquisadas e aplicadas no cultivo *in vitro* para produção de diferentes metabólitos secundários. O cultivo *in vitro* do calo de *Rhodophiala bifida* foi encontrado o alcaloide Montanina (REIS *et al.*, 2004). Já no cultivo *in vitro* de calos e raízes de *Rauvolfia* spp. foi verificado a presença de reserpina, ajmalina, ajmalicina, serpentina e ioimbina (MUKHERJEE *et al.*, 2019). No cultivo *in vitro* de calos de *Catharanthus roseus* foram identificados vinblastina e vincristina (MCGEHEE *et al.*, 2019; SAIMAN *et al.*, 2018). No cultivo de calos da *Rhodophiala pratensis* foi encontrado a Galantamina (TRUJILLO- CHACÓN *et al.*, 2019), enquanto que nos calos e raízes de *Narcissus papyraceus* e de *N. tazetta* além da Galantamina foi encontrado a licorina (TARAKEME *et al.*, 2019).

Até os dias atuais existem poucos estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de *Crotalaria*s, mostrando que a aplicação dos métodos de cultivo em tecidos com espécies de *Crotalaria*s torna-se indispensável, tendo em vista a importância desta espécie para agricultura no controle de nematoides (ANDRADE *et al.*, 2010; SANTANA-GOMES *et al.*, 2019; SCHRAMM *et al.*, 2019).

Além das pesquisas científicas em laboratórios acadêmicos, empresas privadas vêm realizando cultivo de tecido de plantas devido à importância econômica desse processo biotecnológico. No Brasil tem sido relatado cultivos com cana de açúcar, flores, eucaliptos e pinheiros. Em outros países como Alemanha, Holanda, Inglaterra, Índia e EUA, o cultivo de tecido de planta movimentou bilhões de dólares. Assim, esse método biotecnológico vem promovendo a criação de novos laboratórios, empregos, tecnologias e patentes (CID, 2014; MEDINA-BOLIVAR e YANG, 2017).

Assim, este trabalho foi desenvolvido visando aprimorar os conhecimentos das técnicas de cultivo de tecido *in vitro* aplicadas à *Crotalaria*, constituindo uma importante

ferramenta para o melhoramento vegetal, visto que possibilita a obtenção de clones com caracteres agronômicos desejáveis, objetivando a produção contínua sob condições monitoradas, aumento de biomassa e obtenção de maiores teores de metabólitos secundários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral identificar e quantificar alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria retusa* cultivada em vaso e *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos de *Crotalaria retusa* cultivada em vasos;
- Cultivar *in vitro* e obter extratos de diversas fases da vida de *C. retusa*;
- Analisar os extratos obtido com as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas (LC-EM) e espectros no infravermelho;
- Isolar e identificar alcaloides pirrolizidínicos em *C. retusa*, utilizando RMN de ^1H e de ^{13}C .

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Diversas plantas, como a *Crotalaria*, que são ricas em AP começaram a ser estudadas pelos químicos de produtos naturais a partir das preocupações de fazendeiros, em várias partes do mundo, que começaram a associá-las com a intoxicação de ruminantes e equinos, o que acarretava sérios problemas econômicos (MARTINEZ *et al.*, 2013).

Além da questão da intoxicação dos animais e do impacto econômico que essa toxicidade acarreta, outros fatores são relevantes quando se fala em estudo das espécies de *Crotalaria*, uma vez que elas apresentam propriedades que tornam possível a sua utilização como adubo verde para melhorar a qualidade do solo durante a rotação de culturas, e também são úteis no controle de pragas como nematoides, insetos e larvas.

Logo, o estudo dessas plantas pode gerar grande impacto para o setor agrícola e econômico contribuindo para uma produção de formas mais sustentável e menos nocivas de controle de pragas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal cultivado em vaso

As sementes de *Crotalaria retusa* foram semeadas (Figura 6), na Horta velha no campus da Universidade Federal de Viçosa e as partes aéreas foram colhidas entre os meses de janeiro e fevereiro de 2019.

Figura 6: Plantas de *C. retusa* cultivadas em vaso



Fonte: Autor

4.2 Obtenção do extrato etanólico das folhas de *C. retusa*

As folhas de *Crotalaria retusa* (5,8 Kg) foram trituradas em liquidificador comercial e submetidas a extração a frio com etanol comercial (96 °GL), utilizando um volume de 12 L, em um período de seis dias, trocando o solvente a cada 48 horas. Essa solução etanólica foi agitada diariamente e ao completar dois dias realizou-se uma filtração simples obtendo um filtrado que em rotaevaporador foi seco resultando no extrato etanólico bruto. O mesmo foi submetido a uma extração ácido-base.

4.3 Extração ácido-base

O extrato etanólico seco em rotaevaporador foi suspenso em água destilada e o pH ajustado entre 2-3 com solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹. Em seguida, uma extração líquido-líquido foi feita em diclorometano e a fase aquosa foi submetida a redução com Zinco em excesso por um período de dezessete horas. Após a reação de redução completa, foi realizada uma filtração simples e o pH ajustado entre 10-11 com solução de hidróxido de

sódio 1 mol L⁻¹. Para finalizar, os alcaloides pirrolizidínicos foram extraídos com diclorometano, por extração líquido-líquido. Esse procedimento foi repetido várias vezes até a fase aquosa apresentar resultado negativo para o teste utilizando o reagente de Dragendorff. Assim, a fase orgânica contendo os alcaloides pirrolizidínicos foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida, com temperatura do banho de aproximadamente 40 °C, obtendo-se assim, o extrato alcaloídico.

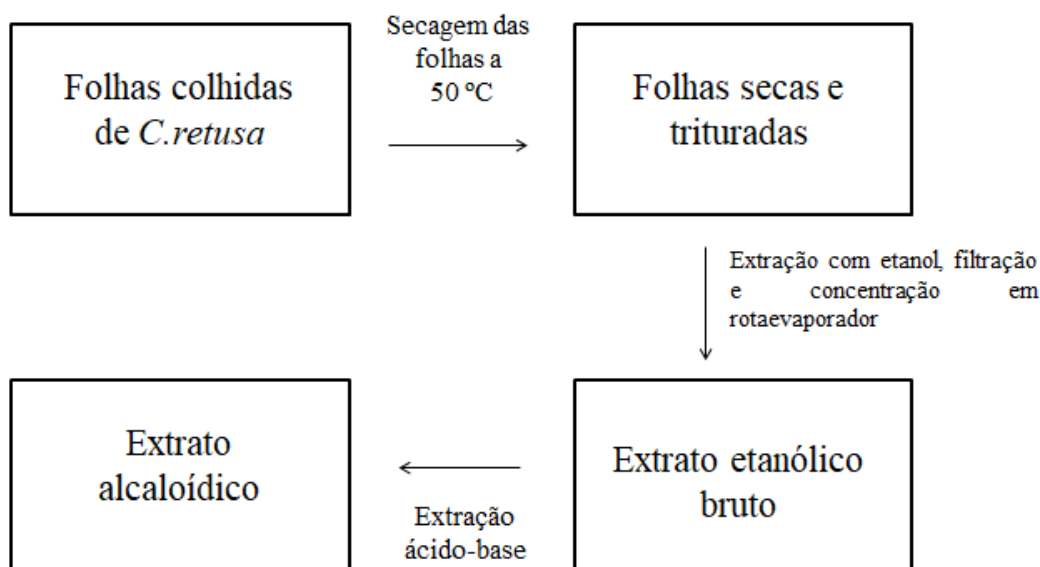
A presença de alcaloides foi detectada através de cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 7). O eluente utilizado foi diclorometano e metanol (9:1) e os compostos foram visualizados sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e em reagente revelador Dragendorff. Uma vez detectada a presença de alcaloides, uma pequena parte de extrato alcaloídico (CRA) e uma pequena porção de extrato bruto, aquele obtido antes de fazer a extração ácido-base (CRB), foram analisados por infravermelho. Outra parte desses dois extratos foi submetida à análise por LC-MS, para que fossem identificados os alcaloides presentes. E, por fim, com o que sobrou de extrato alcaloídico, embora tenha sido uma fração muito pequena (menos que 30 mg), foi realizada uma tentativa de purificação, a fim de separar, isolar e identificar os alcaloides pirrolizidínicos presentes na mistura de extrato alcaloídico. E ainda foi purificada uma parte de extrato alcaloídico obtido de uma extração feita anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (MOURA, 2018). Os procedimentos foram descritos em fluxograma representado na figura 8.

Figura 7: Coloração da placa de CCD revelada com reagente de Dragendorff



Fonte: Autor

Figura 8: Fluxograma do processo de obtenção do extrato alcaloídico



Fonte: Autor

Teste de Dragendorff: O reagente de Dragendorff foi preparado dissolvendo 8 g de subnitrato de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 20 mL de ácido acético que foram transferidos para um Becker contendo 50 mL de solução aquosa de iodeto de potássio (KI) $3,3 \text{ mol L}^{-1}$ (JIA & TIAN, 2007). Para avaliar a presença de alcaloides, cerca de 2 mg de extrato foram adicionados a tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada. Em seguida, solução aquosa de ácido clorídrico a 2 mol L^{-1} foi acrescentada gota a gota pelas paredes dos tubos até a completa dissolução do extrato. Por último, foi adicionado 1 mL da solução de reagente de Dragendorff a cada tubo de ensaio. Dessa forma, a presença de alcaloides foi constatada pela formação de um precipitado laranja avermelhado (SILVA *et al.*, 2010; SILVA & LIMA, 2016).

4.4 Análise na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000 do departamento de química da UFV. As análises dos extratos foram feitas por meio do método de reflectância total atenuada (ATR).

4.5 Análise em LC-MS

As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico Acquity UPLC (Waters), acoplado a um quadrupolo/tempo de voo (QTOF, Waters). As execuções cromatográficas foram realizadas em um Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 mm, 1,7 μm), temperatura fixa de 40 °C. O sistema de eluição com gradiente binário consistiu em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B). As condições de eluição da UPLC foram otimizadas da seguinte forma: gradiente linear de 2 a 95% B (0-15 min), 100% B (15-17 min), 2% B (17,01), 2% (17,02-19,01), a 0,4 mL⁻¹ e volume de injeção de amostra de 5 μL . A presente análise foi realizada na EMBRAPA do Ceará sediada em Fortaleza.

O perfil químico das amostras foi realizado acoplando o sistema Waters ACQUITY UPLC do espectrômetro de massa QTOF (Waters, Milford, MA, EUA) com a interface de ionização por eletropulverização no modo de ionização positiva (ESI+). O modo ESI+ foi adquirido no intervalo de 110-1180 Da. Temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, vazão do gás de desenvolvimento de 500 L h⁻¹, cone de extração de 0,5 V, tensão capilar de 3,2 kV.

A encefalina leucina foi utilizada como massa de bloqueio. O modo MS usou o Xevo G2-XS QTOF. O espectrômetro operava com programação centróide MS^E usando uma rampa de tensão de 20 a 40 V. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

Os dados gerados pelas análises UPLC-QTOF-MSE foram processados no software MassLynx versão 4.1. A comparação de todos os picos no cromatograma de massa foi feita com base em uma tolerância de $\pm 0,05$ min para o tempo de retenção e $\pm 0,05$ Da para a massa exata. Todas as fórmulas moleculares possíveis foram deduzidas usando a ferramenta de composição elementar da MassLynx.

4.6 Purificação do extrato alcaloídico

Para a purificação do extrato alcaloídico utilizou-se colunas cromatográficas empacotadas com sílica-gel 60 (70-230 mesh) e fase móvel diclorometano/metanol (9:1). As plaquinhas de CCD utilizadas foram de alumínio Whatman UV 254 (0,25 mm) recobertas com sílica-gel e a fase móvel utilizada foi também de diclorometano/metanol variando o metanol de 1% a 100%. As CCD foram observadas sob lâmpada ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e reveladas em solução de Dragendorff, que confirmou a presença de alcaloides pirrolizidínicos

uma vez que foi indicada a existência do nitrogênio das prováveis estruturas dos alcaloides, que podemos perceber pelo aparecimento de manchas de cores alaranjadas características.

4.7 Isolamento utilizando HPLC

As análises no HPLC foram realizadas no cromatógrafo líquido (SHIMADZU, modelo LC-10AD) com detector UV-Visível (SPD-10AV) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (C-18-Varian, 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Depois de analisadas no HPLC, as amostras foram liofilizadas no Liofilizador (LIOTOP, L101).

As frações de interesse foram injetadas no HPLC para obter a separação dos alcaloides pirrolizidínicos. Dissolveu-se 1 mg de amostra em 1 mL de fase móvel que foram aplicadas manualmente com um volume de injeção igual a 20 μ L, fluxo constante de 0,7 mL min⁻¹ e coluna NSTC18 (250 mm x 3,0 mm x 5 μ m) LC100111 (NST) para, então, se escolher as melhores condições de injeções. A coluna foi trocada e foram realizadas as separações usando coluna semi-preparativa. Utilizou-se as seguintes condições: fase móvel-água/acetoneitrila (6,5:3,5) com pH ajustado para 11 com solução de hidróxido de amônio (NH₄OH).

4.8 Análise por RMN

Foram realizadas análises de RMN em espectrômetro BRUCKER DRX-400, linha AVANCE, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Utilizou-se como padrão interno Tetrametilsilano (TMS) e como solvente metanol deuterado.

4.9 Cultivo *in vitro*

Preparo do meio de cultivo: Primeiramente foram separados 25 tubos de ensaio para cada espécie de *Crotalaria* (*C. juncea*, *C. retusa*, *C. ochroleuca* e *C. spectabilis*) e 5 Erlenmeyers para cada planta. O meio sólido foi preparado para os tubos de ensaio e meio líquido para os Erlenmeyers. Para o preparo dos meios foram pesados os reagentes: 4,4 g de meio de cultura, 0,104 g de vitamina, 0,1 g de inositol, 30 g de sacarose e 5,5 g de ágar (Merck) e adicionado 1 litro de água autoclavada. O pH do meio foi ajustado para aproximadamente 5,8. Em seguida o meio foi aquecido até a mistura ficar límpida e uma

quantidade de 15 mL foi transferida para cada tubo de ensaio. No meio líquido não foi acrescentado 5,5 g de ágar. Então o meio líquido com 4,4 g de meio de cultura, 0,104 g de vitamina, 0,1 g de inositol, 30 g de sacarose e 1 litro de água autoclavada também foi aquecido e adicionado aos Erlenmeyers. Tanto os tubos de ensaio quanto os Erlenmeyers foram fechados e autoclavados.

Realização do cultivo: Primeiramente as sementes de *C. juncea*, *C. retusa*, *C. ochroleuca* e *C. spectabilis* foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas onde foram imersas por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) com 1% de cloro ativo (p/p) (Super Globo[®], Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, foram realizadas lavagens com álcool etílico (EtOH) 70% por 1 minuto e 4 enxagues em água autoclavada. Após a desinfestação, 4 sementes de cada espécie foram transferidas separadamente para tubos de ensaio com meio de cultura previamente preparado, deixadas no escuro por 15 dias e depois em ambiente claro para a germinação com controle de luz e de temperatura. As observações das culturas foram realizadas diariamente. As plantas germinadas foram transferidas para outro meio de cultivo para multiplicação das brotações. Para esta etapa foi preparado meio líquido e meio sólido sendo que as raízes foram colocadas no meio líquido e os caules no meio sólido. Após a multiplicação, foram realizadas as extrações da raiz, caule e calo com metanol. A presença de alcaloides foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) e revelada com reagentes de Dragendorff. Os extratos foram concentrados do evaporador rotatório e armazenados na geladeira para posteriores análises.

4.10 Teste nematocida

A partir de colheita de partes das plantas de *C. retusa* foi produzido extrato etanólico como descrito no item 4.2 para as partes aéreas e para as raízes, esses extratos foram submetidos a ensaios biológicos preliminares para teste nematocida.

Os extratos das espécies de *Crotalaria* foram submetidos a ensaios biológicos sobre os fitonematóides *Meloidogyne incognita* e *M. exigua* para investigação da atividade nematocida. Os referidos extratos foram solubilizados em Tween 80 do agente emulsificante (2% m/v), com concentração final de cada amostra de 1 mg mL⁻¹. A suspensão aquosa do nematoide foi obtida através da eclosão de massas de ovos multiplicadas em tomateiros cv. Santa Cruz, armazenados em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Atividade nematicida dos extratos foi avaliada em microplacas de 96 orifícios de fundo plano (capacidade de cada orifício: 300 μL , placas do tipo Elisa). Foram utilizados 100 μL de solução aquosa suspensão, contendo aproximadamente 50 segundo estágio (J2) juvenis e 100 μL de cada solução do extrato. Os testes nematicidas foram montados em placas Elisa em uma câmara de fluxo laminar vertical para minimizar a possível contaminação da amostra. Após a montagem, as placas foram seladas com filme de poli (cloreto de vinil) (PVC) e armazenado em demanda biológica de oxigênio (DBO) a 25 °C na ausência de luz.

Água destilada e Tween 80 foram mantidas em autoclave por 15 min. Tween aquoso 80 (2%) e água destilada foram usadas como controle negativo. Solução aquosa carbofuran (2,3-di-hidro-2,2-dimetil-1-benzofuran-7-il-N-metilcarbamato, 98% (Sigma-Aldrich) na concentração de 17,5 mg mL^{-1} foi usada como controle positivo.

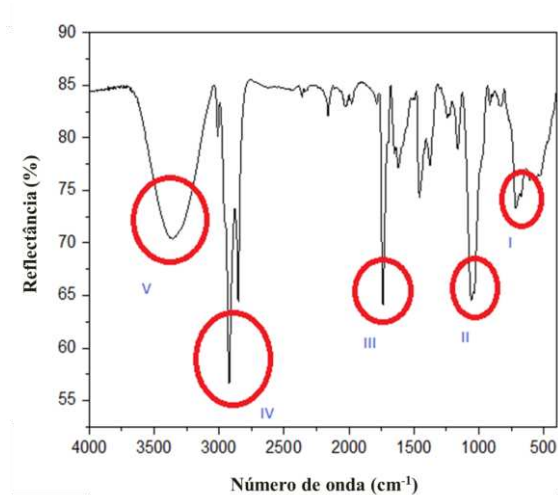
A mortalidade foi avaliada nas 24, 48 e 72 horas após aplicação de tratamento, utilizando uma placa Elisa para cada dia de a avaliação. Para a avaliação, 5 μL de uma solução aquosa de NaOH (1,0 mol L^{-1}) foi adicionada a cada orifício da placa e, em seguida, o número de nematoide vivos e mortos foram contados. Nematóides que mudaram de forma corporal dentro 1 minuto foi considerado vivo, enquanto nematóides que não reagira à adição de NaOH foram considerados mortos. Os valores foram transformados em porcentagem pela análise estatística análise. Este experimento foi realizado de forma aleatória com cinco repetições para cada tratamento. O teste foi realizado duas vezes para confirmar os resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise por infravermelho

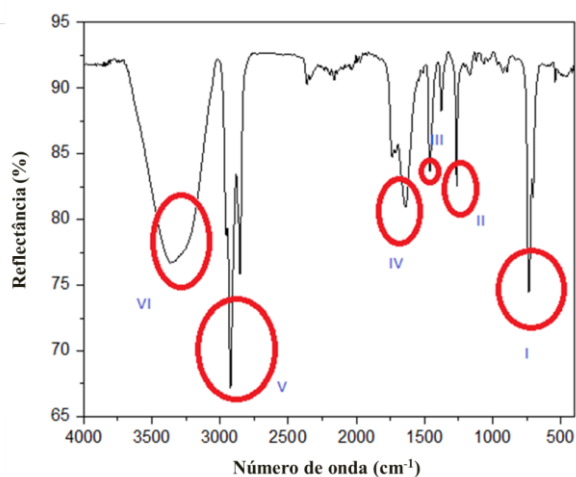
Para a análise no infravermelho foram enviadas duas amostras, uma de extrato bruto (CRB), extrato etanólico obtido antes da extração ácido-base, e outra do extrato alcaloídico (CRA) não purificado. Os espectros no infravermelho de ambos os extratos (Figuras 9 e 10) foram analisados e comparados.

Figura 9: Espectro no infravermelho do extrato etanólico bruto



Fonte: autor

Figura 10: Espectro no infravermelho do extrato alcaloídico



Fonte: autor

Para o extrato bruto (CRB) as principais bandas apresentadas foram descritas na tabela

1.

Tabela 1: Lista das principais bandas do espectro no IV do extrato bruto (CRB).

Banda relevante	Indicativo
I (770-735 cm^{-1})	Anel aromático com deformação angular de 4H adjacentes (anéis orto-substituídos), podendo ser indicativo de piridina orto-substituída.
II (1340-1250 cm^{-1})	Ligação C-N de aromáticos
III (1700-1630 cm^{-1})	Amidas não substituídas
IV (2960-2850 cm^{-1})	Ligação C-H de compostos alifáticos.
V (3500-3070 cm^{-1})	Ligação N-H

Fonte: autor

Sendo que a presença da banda III, amidas não substituídas livres, em aproximadamente 1690-1650 cm^{-1} , é referente a um efeito de conjugação ou a efeitos indutivos que causam deslocamento de cerca de 15 cm^{-1} para frequência mais alta. E para a banda V (3500-3070 cm^{-1}) tem-se a ligação N-H, que pode ser um NH_2 livre em aminas primárias; NH_2 livre em amidas; NH_2 associado em amidas: 3350-3100 cm^{-1} ; NH livre em aminas secundárias, aminas aromáticas: 3450 cm^{-1} pirróis, indóis: 3490 cm^{-1} , NH livre em amidas: 3460-3420 cm^{-1} , NH associado em amidas: 3320-3070 cm^{-1} (BARBOSA, 2007).

Como era de se esperar há a indicação da existência de compostos nitrogenados. Por se tratar de um extrato etanólico bruto, onde tem-se uma mistura de muitos compostos pode-se imaginar que esses compostos nitrogenados sejam alcaloides N-óxidos juntamente com os alcaloides reduzidos. No entanto na etapa de extração ácido-base os N-óxidos serão reduzidos por reação com zinco em pó.

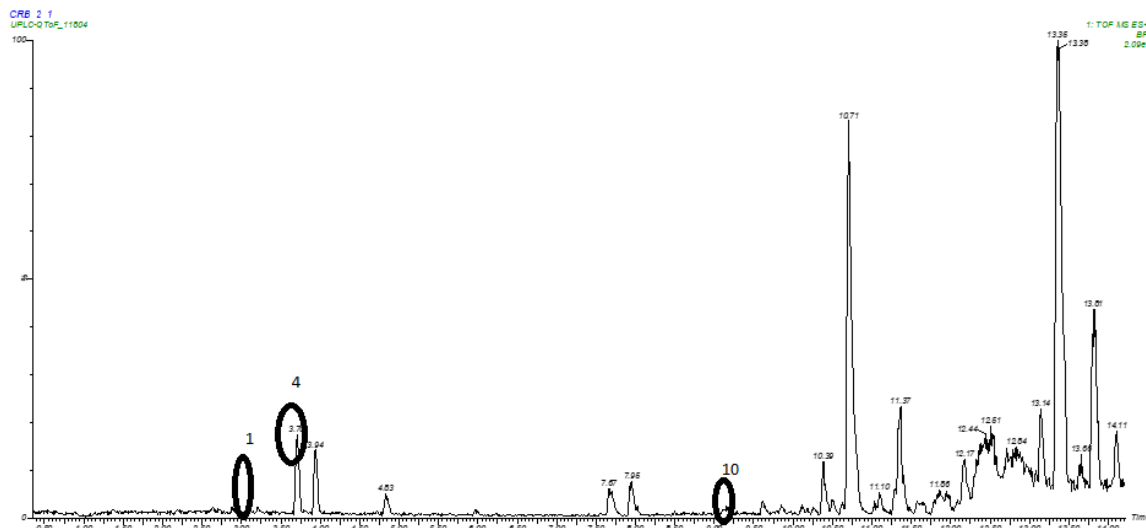
As principais bandas obtidas no espectro no infravermelho do extrato alcaloídico não purificado estão destacadas na Tabela 2.

Tabela 2: Lista das principais bandas no espectro no IV do extrato alcaloídico (CRA)

Banda relevante	Indicativo
I (770-735 cm^{-1})	Anel aromático com deformação angular de 4H adjacentes (anéis orto-substituídos).
II (1280-1180 cm^{-1})	Ligação C-N de compostos alifáticos alifáticos.
III (1420 e 1300-1200 cm^{-1})	Ligação C-O de ácidos carboxílicos Aparecem duas bandas de deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação axial de C-O.
IV (1700-1630 cm^{-1})	Ligação C=O de amidas Amidas.
V (2960-2850 cm^{-1})	Ligação C-H de compostos alifáticos.
VI (3500-3070 cm^{-1})	Ligação N-H

Fonte: autor

Figura 12: Cromatograma obtido a partir da injeção de extrato alcaloídico (CRA)



Fonte: autor

No que diz respeito à Figura 11, o cromatograma foi obtido pela injeção de extrato etanólico bruto. Nesse cromatograma observa-se como pico (1-7) de interesse alcaloides pirrolizidínicos dada a ordem de eluição. Também foi possível identificar os flavonoides (8-10).

Na Figura 12 está presente o cromatograma obtido a partir da injeção de extrato alcaloídico. O primeiro sinal obtido é referente a um *N*-óxido.

Ao fazer a extração ácido-base e a redução com o tratamento do extrato bruto com zinco em pó, os alcaloides pirrolizidínicos *N*-óxidos presentes no mesmo sofrem redução e apenas os alcaloides são extraídos, isso explica o fato de existirem menos sinais, e para esse caso ainda estima-se que o tempo de redução tenha sido pouco, pois ainda restou um *N*-óxido na amostra.

Na Tabela 3 está indicada a presença de três compostos na forma de *N*-óxido presente no extrato etanólico bruto.

Tabela 3: Compostos químicos identificados nos extratos de *Crotalaria retusa* utilizando a técnica UPLC-QTOF-MSE.

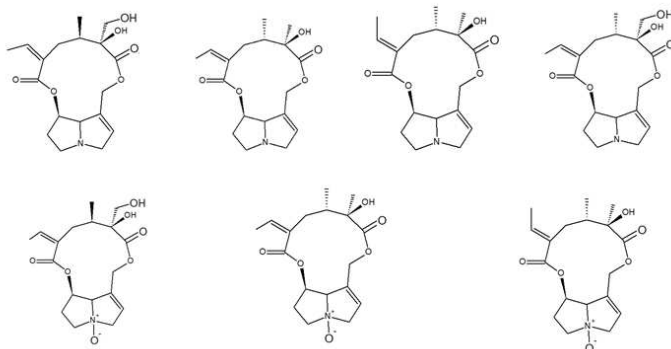
Picos	t _R (min)	[M+H] ⁺ Observado	[M+H] ⁺ Calculado	MS/MS	Fórmula Molecular	Tentativa de Identificação	Extrato A*	Extrato B**	Referência
1	3,11	352,1744	352,1760	120,0773	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	Integerremina- N-óxido	+	+	Yang et al., 2011
2	3,16	352,1770	352,1760	136,0672	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	Senecionina- N-óxido	+	-	Yang et al., 2011
3	3,18	368,1709	368,1709	136,0760	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	Retrorsina-N- óxido	+	-	Wang et al., 2019
4	3,79	336,1814	336,1811	120,0756	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	Integerrimina	+	+	Bolechová et al., 2015
5	3,85	336,1808	336,1811	138,0811	C ₁₈ H ₂₅ NO ₅	Senecionina	+	-	Yang et al., 2011
6	3,89	352,1755	352,1760	120,0835	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	Usaramina	+	-	Yang et al., 2011
7	3,92	352,1780	352,1760	136,0706	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	Retrorsina	+	-	Yang et al., 2011
8	8,14	301,0718	301,0712	279,0928	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Isokaempferida	+	-	Chen et al., 2019
9	8,44	403,1396	403,1393	373,0903	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	Nobiletina	+	-	Faqueti et al., 2017
10	9,10	373,1273	373,1287	343,0798	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	Sinensetina	+	+	Faqueti et al., 2017

Fonte: autor

Na tabela acima, Extrato A* se refere ao extrato etanólico bruto e Extrato B** ao extrato alcaloídico.

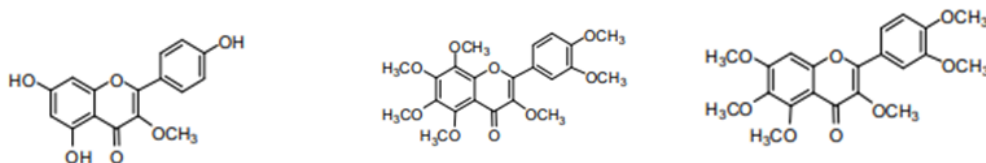
Nas Figuras 13 e 14 estão representadas as estruturas dos alcaloides e dos N-óxidos correspondentes e flavonoides que foram identificados nas análises feitas por LC-MS.

Figura 13: Retrorsina, senencionina, integerrimina, usaramina, retrorsina N-óxido, senencionina N-óxido e integerrimina N-óxido



Fonte: Autor

Figura 14: Isokaempferida, nobiletina e sinensetina



Fonte: Autor

A *C. retusa* é uma espécie que ainda é pouco estudada e não existem muitos compostos da classe de alcaloides pirrolizidínicos identificados nesta espécie. O mais conhecido deles é a monocrotalina, que teve sua elucidação citada por Tamariz *et al.* (2018). Também foram identificados nesta espécie a retrorsina, a senecionina e a integerrimina (ZHANG *et al.*, 2017).

5.3 Purificação do extrato alcaloídico

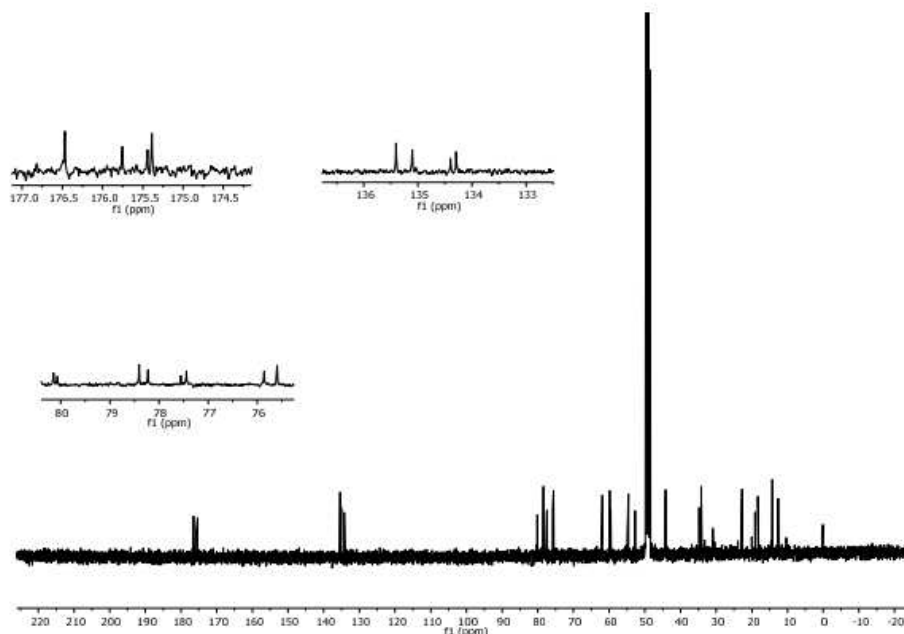
5.3.1 Separação em coluna cromatográfica

Após eluição em coluna cromatográfica de sílica gel, foram coletadas as frações que foram monitoradas por CCD e reveladas com reagente de Dragendorff para confirmar a presença dos alcaloides. Assim, tanto as manchas como os valores de R_f (fator de retenção) dos compostos foram observados.

5.3.2 Isolamento utilizando HPLC

Com a eluição, a solução de cada composto presente nessa amostra foi coletada em erlenmeyers, concentrada em rotavapor para eliminar a acetonitrila e, em seguida, cada amostra foi liofilizada, obtendo-se, assim, os compostos que foram identificados pela análise de seus espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C. Desta forma, um dos compostos isolados foi caracterizado e nomeado como JC3 (Figura 15).

Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) da amostra JC3

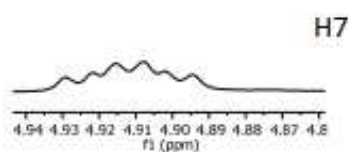


Fonte: autor

Por este espectro é possível observar que os sinais estão duplicados, o que indica que pode se tratar de uma mistura de diastereoisômeros. A partir desta hipótese foi feita uma nova separação em coluna cromatográfica empacotada com sílica-gel 60 (70-230 mesh) e fase móvel diclorometano/metanol (9:1), seguindo o mesmo processo descrito em 4.6. As amostras obtidas foram testadas novamente obtendo-se os espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT, da fração de maior quantidade. A Figura 18 mostra o RMN de ^1H da amostra JC3*.

Como os alcaloides pirrolizidínicos têm como característica principal a presença da base necina e a caracterização começou a ser feita pelos hidrogênios dessa base. O H2 foi o que apresentou maior deslocamento químico (δ), por estar ligado a um carbono hibridizado sp^2 . Os hidrogênios H3a e H3b são diastereotópicos, pois estão em ambientes químicos diferentes e apresentam deslocamento químico entre δ 2,96 e 2,98 como de um duplo duplete.

Figura 16: Multiplete relacionado a H7

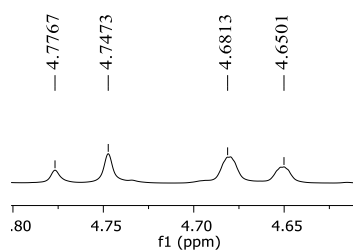


Fonte: autor

O multipletto relacionado ao H7 é mais desblindado (Figura 16) pelo fato de estar ligado a um carbono ligado a oxigênio (átomo mais eletronegativo), apresentando um deslocamento químico em δ 4,89-4,93.

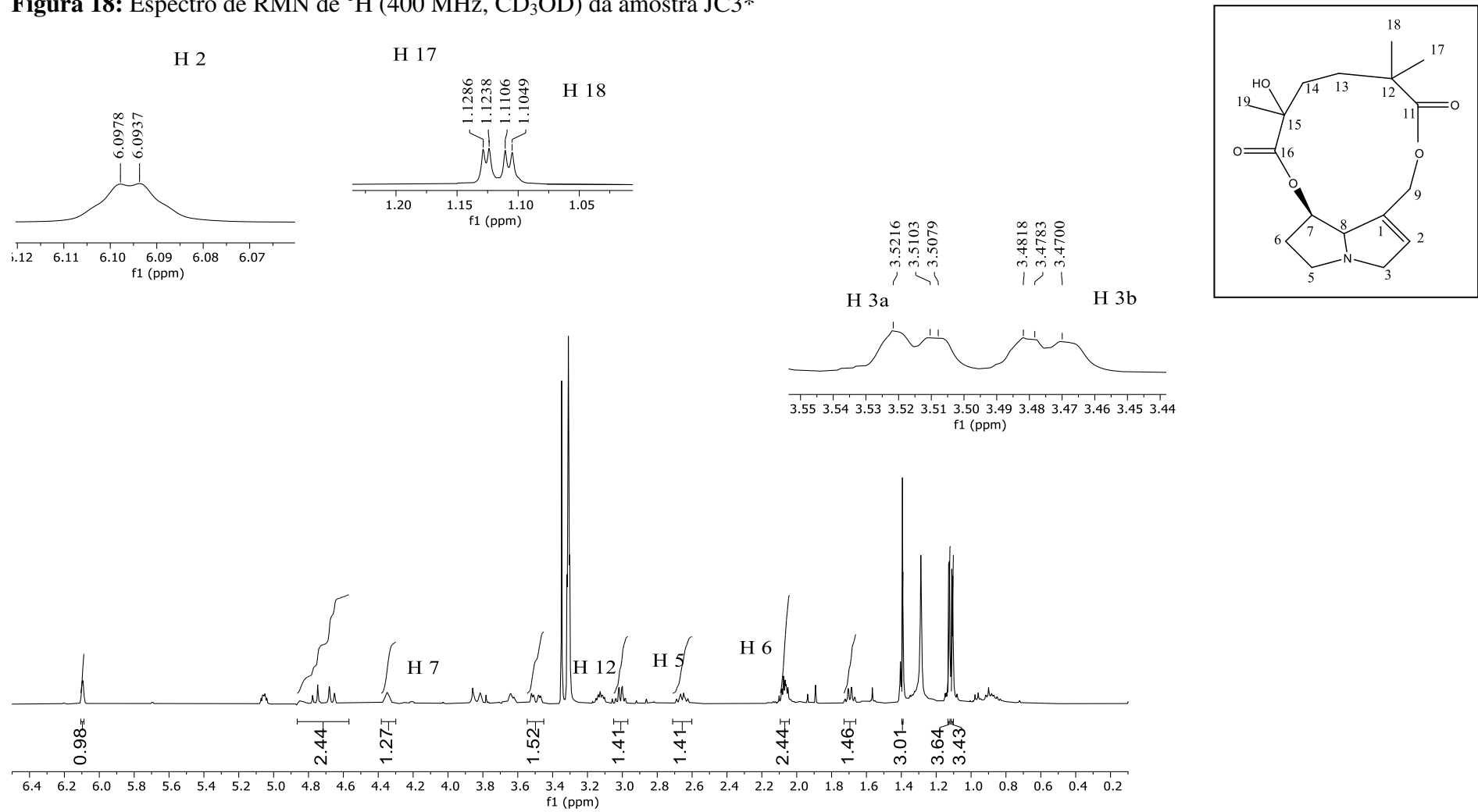
Para a confirmação do fechamento da molécula foram analisados os hidrogênios H9, H13, H14. Os hidrogênios H9 são diastereotópicos e por estarem em ambientes químicos diferentes apresentaram um duplo dupletto, com deslocamento químico entre δ 4,60-4,70 (Figura 17)

Figura 17: Duplo dupletto referente a H9a e H9b



Fonte: Autor

Figura 18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da amostra JC3*



Fonte: autor

A estrutura proposta para JC3* cujo espectro de RMN de ^1H foi mostrado na Figura 18 está representada abaixo e as atribuições de todos os hidrogênios identificados nesse espectro para JC3* estão na Tabela 4.

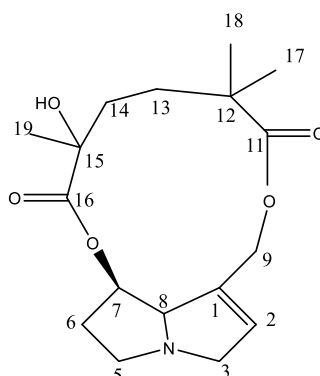


Tabela 4: Atribuições dos hidrogênios da molécula do alcaloide pirrolizidínico JC3*

Hidrogênio	Multiplicidade/número de hidrogênios	Constante de Acoplamento (Hz)	Deslocamento químico (δ) em ppm
H2	Dupleto/1H	$J=1,6$	6,03
H3	Duplo dupleto/2H	$J^2=4,3$ $J^3=1,4$	2,96
H5	Multiplete/2H	-	2,50-2,60
H7	Multiplete/1H	-	4,80
H8	Multiplete/1H	-	1,60
H9	Duplo dupleto/2H	$J^2=11,7$	4,70
H13	Multiplete/2H	-	1,03
H14	Multiplete/2H	-	1,01
H15	Multiplete/2H	-	1,00
H18	Simpleto/3H	-	1,30
H19	Simpleto/3H	-	1,20
H20	Simpleto/3H	-	1,30

Fonte: Autor

Na Figura 19 está representado o espectro de RMN de ^{13}C e assim como no espectro de RMN de ^1H os carbonos 1 e 2 são hibridizados sp^2 e apresentam deslocamento químico em aproximadamente 135 e 133 ppm, respectivamente. Os carbonos 3, 5 e 8 estão ligados diretamente ao nitrogênio e apresentam deslocamentos químicos de 74, 53 e 76 ppm, respectivamente, sendo o C8 o mais desblindado por estar ligado também ao C1 que é hibridizado sp^2 .

Os carbonos 11 e 16 possuem com deslocamentos químicos de 174 e 175 ppm atribuídos aos carbonos das carbonilas dos ésteres. Na Tabela 5 estão as demais atribuições de carbono para esta molécula.

Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da amostra JC3*

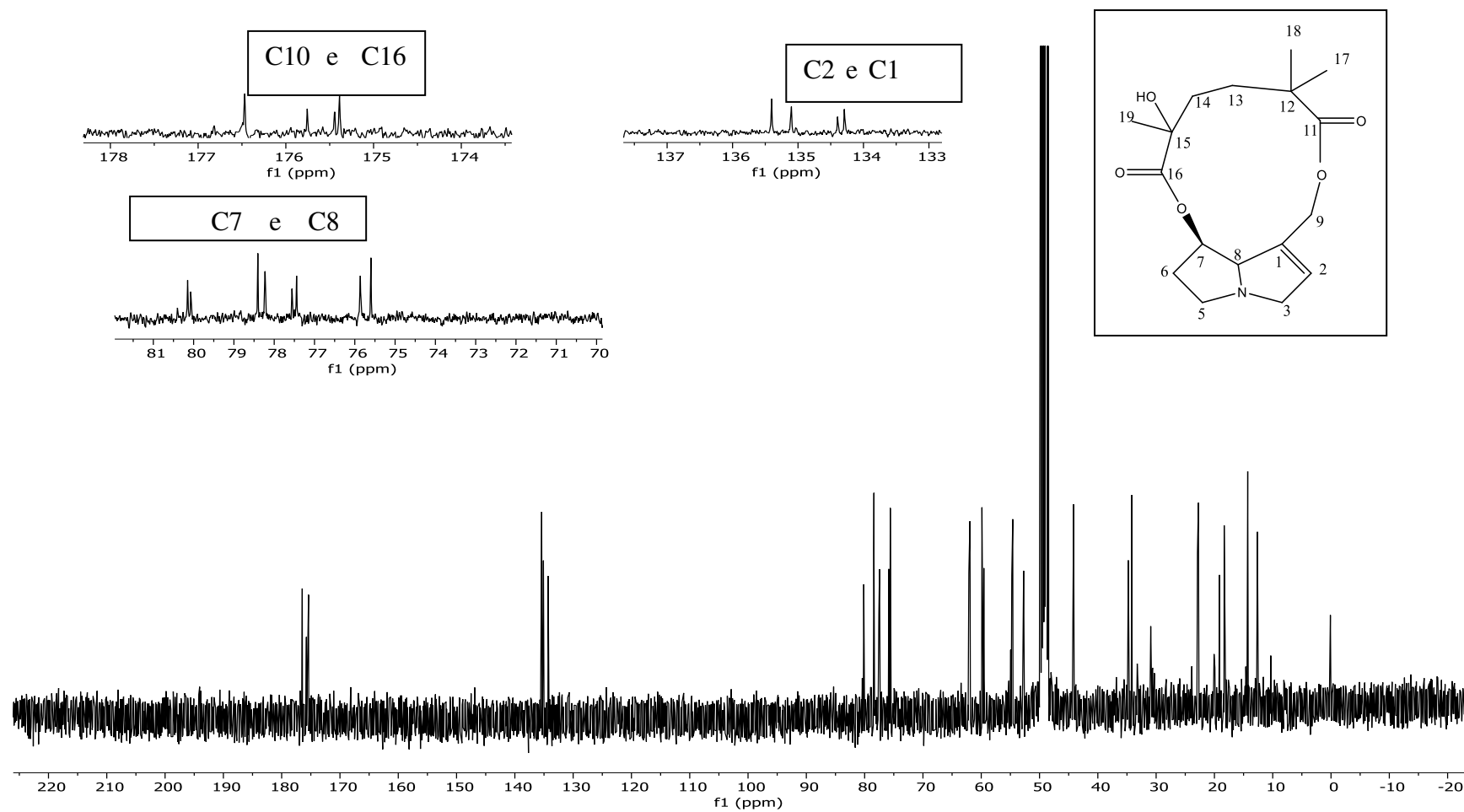


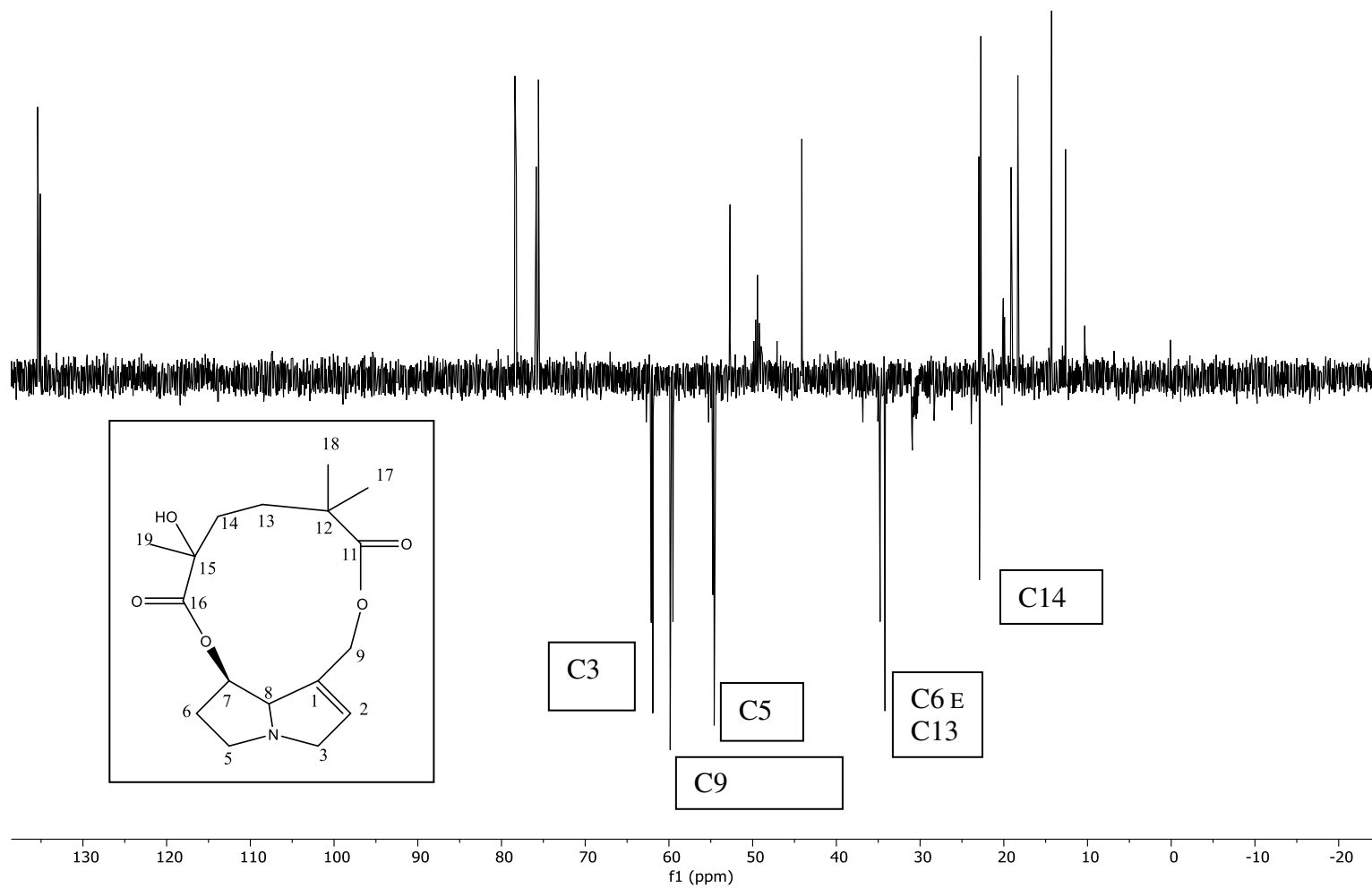
Tabela 5: Atribuições dos átomos de carbono da molécula do alcaloide pirrolizidínico isolado

Carbono	Deslocamento químico encontrado (δ) em ppm
C1	134,8
C2	135,6
C3	62,1
C5	52,5
C6	34,2
C7	78,6
C8	75,8
C9	59,8
C11	176,5
C16	175,4
C15	44,7
C14	22,8
C13	35
C19	18,5
C18	12,6
C17	14,6

Fonte: Autor

O DEPT foi usado para comprovar os grupos CH₂ presentes na molécula. O espectro representado pela figura 20 traz as seguintes confirmações: C3, C5, C6, C9, C13 e C14 e com seus respectivos deslocamentos químicos e os sinais de cada carbono no espectro DEPT 135 do alcaloide isolado JC3*.

Figura 20: Experimento DEPT da amostra JC3* (RMN de ^1H a 400 MHz e RMN de ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD)



Fonte: Autor

Com os espectros obtidos e fazendo as devidas comparações com a literatura foi possível propor a estrutura da molécula correspondente ao alcaloide JC3*, que seria a porção de maior quantidade na separação da mistura racêmica obtida pela amostra JC3. A quantidade de amostra resultante foi insuficiente para realizar experimentos de HSQC, HMBC e COSY e propor a estereoquímica dos carbonos estereogênicos.

5.4 Cultivo *in vitro*

As sementes de *Crotalaria* apresentaram 100% de germinação, iniciando a emergência das plântulas *in vitro* aos oito dias após a sementeira e estabilizando-se aos 25 dias.

Com relação à curva de crescimento das raízes foi observado um aumento de massa no período de 25 dias, conforme mostra a figura 21, esse resultado é interessante para possível cultivo *in vitro* em biorreatores.

Os extratos alcaloídicos obtidos serão enviados para análise em LC-MS, assim como os extratos de plantio em vaso, para que sejam feitas as análises e as devidas comparações. Espera-se como continuação desse projeto quantificar os alcaloides pirrolizidínicos em toda a extensão da planta (raiz, caule, folhas e flores) e em etapas diferentes de vida da mesma.

Figura 21: Cultivo *in vitro* *C. retusa*



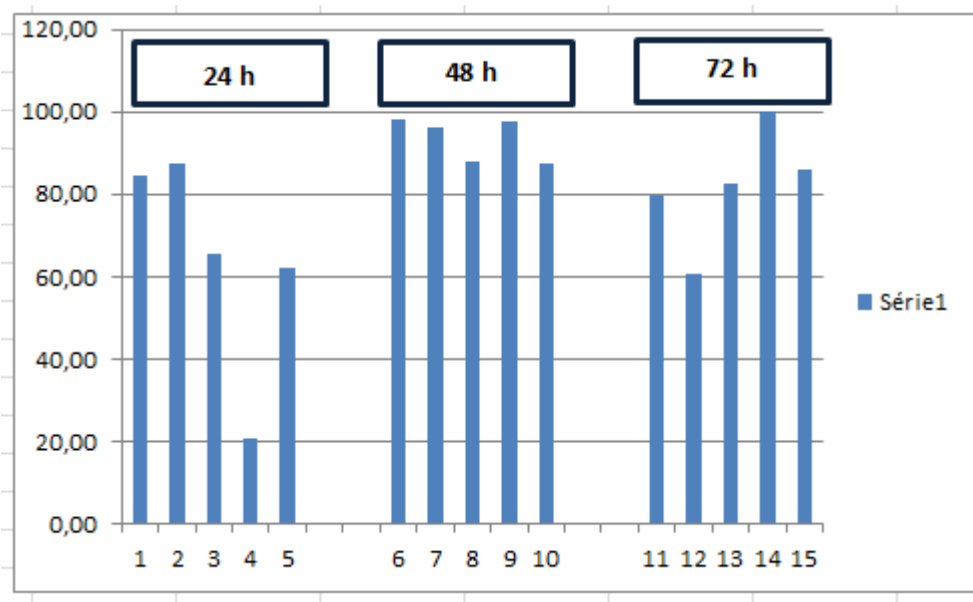
Fonte: Autor

5.5 Ensaios preliminar: efeito na mortalidade dos nematoides

Depois da realização do procedimento descrito no item 4.9, realizou-se a contagem dos nematoides vivos e mortos em 24, 48 e 72 horas para posteriormente analisar

estatisticamente os valores obtidos. Na Figura 22 estão apresentadas as porcentagens de mortalidade dos nematoides do gênero *Meloidogyne incognita*.

Figura 22: Porcentagem de mortalidade dos nematoides



Fonte: Autor

De acordo com o gráfico é possível perceber que após 24 horas, as barras de 1-5, indicam que houve mortalidade de até 94% dos nematoides, após 48 horas, as barras de 6-10, indicam que houve mortalidade de até 98% dos nematoides e por fim após 72 horas, as barras de 11-15, indicam que houve uma média de 81,77% dos nematoides com alguns extratos apresentando 100% de mortalidade.

6 CONCLUSÃO

A técnica de análise por espectrometria no infravermelho é utilizada apenas para a identificação de grupos funcionais, ela é muito eficiente em nesses casos cuja finalidade seja conhecer os grupos funcionais presentes na amostra. No entanto, para a elaboração desse trabalho, a análise foi realizada apenas para confirmar se estavam presentes compostos nitrogenados que seriam indícios da presença dos alcaloides pirrolizidínicos.

A análise feita utilizando-se a técnica de UPLC-QTOF-MSE mostrou-se eficiente para identificação de compostos presentes em extratos de *Crotalaria*. Com ela foi possível identificar alguns flavonoides, nobiletina, sinensetina e o composto isokaempferida, alcaloides pirrolizidínicos, como a retrorsina, senecionina, integerrimina e usaramina, e os *N*-óxidos, senecionina *N*-óxido, integerrimina *N*-óxido, retrorsina *N*-óxido, presentes em cada amostra analisada.

Para isolar um alcaloide presente nesses extratos seria necessária uma quantidade maior de extrato para que pudesse ser feita a purificação em coluna cromatográfica e depois a separação em HPLC. A quantidade de extrato obtida foi insuficiente para tanto, uma vez que os alcaloides se tratam de metabólitos secundários da planta (mecanismos de defesa), mesmo que todos os cuidados de plantio e colheita sejam tomados, não é possível garantir que serão encontrados os mesmos tipos e as mesmas quantidades de alcaloides em todas as plantas em plantios diferentes, uma vez que o clima, o solo e as demais condições mudam.

As técnicas utilizadas para o isolamento de alcaloides se mostraram muito eficientes, tornando possível isolar e propor a estrutura de uma AP, como foi descrito no decorrer desse trabalho.

Com relação ao cultivo *in vitro*, os resultados mostraram o aumento da massa das raízes, sendo uma maneira alternativa para obtenção de metabólitos secundários de interesse.

Por meio do teste nematocida foi possível confirmar efeito nematocida do extrato bruto da raiz, confirmando que essa espécie pode ser considerada uma alternativa futura para o desenvolvimento de nematocidas.

O estudo de AP é muito promissor, devido à sua importância ambiental e econômica também descrita anteriormente. Em relação às perspectivas futuras pretende-se um estudo detalhado de cada etapa de crescimento das plantas dessa espécie, a fim de quantificar a produção da maior quantidade de alcaloides e localizar em que parte da planta se concentra mais esses compostos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. A. V.; ORTOLANI, F. A.; MORO, J. R.; MORO, F. V. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey (Papilionoideae - Fabaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 1150-1162, 2008.

AHMAD, A.; ALI, A.; SHAFIQ, M.; HAIDER, M. S.; NASIR, I. A.; HUSNAIN, T. Assessment of association among various morphological traits of *Euphorbia granulata*, *Euphorbia hirta*, *Fumaria indica* and *Parthenium hysterophorus*. **Nature and Science**, v. 13, p. 47-51, 2018.

ANDRADE, L. B. D.; OLIVEIRA, A. S.; RIBEIRO, J. K. C.; KIYOTA, S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SALES, M. P. Effects of a Novel Pathogenesis-Related Class 10 (PR-10) Protein from *Crotalaria pallida* Roots with Papain Inhibitory Activity against Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 58, p. 4145-4152, 2010. doi:10.1021/jf9044556.

ARAGÃO, D. P.; VIEIRA, B. B.; SANTANA, T. A. B.; SILVA, L. P.; OLIVEIRA, R. M.; PEREIRA, A. P. C.; FERREIRA, A. C. T.; BARBOSA, G. P. R.; OLIVEIRA, A. L.; SOARES, J. The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, 2017, p. 536-542.

BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Ed.1. UFV. 2007.

CARVALHO, A. C. P. P.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. A. B.; LEMOS, E. E. P.; SOUZA, F. V. D.; PETER, J. A.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 7, p. 30-60, 2011.

TRUJILLO-CHACÓN, L. M.; ALARCÓN-ENOS, C. L.; CÉSPEDES-ACUNA; BUSTAMANTE, L.; BAEZA, M.; LÓPEZ, M. G.; MENDIVEL, C. F.; CABEZAS, F.; NAVARETE, E. R. P. Neuroprotective activity of isoquinoline alkaloids from of Chilean Amaryllidaceae plants against oxidative stress-induced cytotoxicity on human neuroblastoma SH-SY5Y cells and mouse hippocampal slice culture. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, ID 110665, 2019.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review on phytopathology**, v. 4, n. 1, 2002, p 221-249.

CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3. edição, Embrapa Informação Tecnológica: Brasília. – DF, p.159-178, 2014.

DAMOUR, G.; GUERIN, C.; DOREL, M. Dataset on early growth of cover crops in growth Chamber. **Data in brief**, v. 29, ID 105262, 2020

DEY, P.; KUNDU, A.; KUMAR, A.; GUPTA, M.; LEE, B. M.; BHAKTA, T.; DASH, S.; KIM, H. S. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In: **Recent Advances in Natural Products Analysis**, Cap. 15, 2020 p. 505-567.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. 3rd ed. The Atrium, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd; 2009, p. 311-481.

DUARTE, D. F. Opium and Opioids: A Brief History. *Revista Brasileira Anestesiologia*, v. 55, 2005, p. 135-146.

FILOVÁ, A. Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 46, 2014, p. 236-245.

FLETCHER, M.; MCKENZIE, R.; BLANEY, B.; REICHMANN, K. Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria taxa* from northern Australia: Risk to grazing livestock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 2009, p. 311-319.

GAI, Q.Y.; JIAO, J.; LUO, M.; WEI, Z. F.; ZU, Y. G.; MA, W.; FU, J. Y. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. **Plos One**, v. 10, ID e0119022, 2015.

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, ID 110923, 2020.

GEBUREK, I.; PREISS-WEIGERT, A.; LAHRSEN-WIEDERHOLT, M.; SCHRENK, D.; THESE, A. In vitro metabolism of pyrrolizidine alkaloids – Metabolic degradation and GSH conjugate formation of different structure types. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, ID 110868, 2019.

GELVIN, S. B. Agrobacterium in the genomics age. **Plant Physiology**, v. 150, 2009 p. 1665-1676. doi: 10.1104/pp.109.139873.

GEORGIEV, M. I.; AGOSTINI, E.; LUDWIG-MÜLLER, J.; XU, J. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 528-537, 2012. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.001>.

HÄKKINEN, S. T.; MOYANO, E.; CUSIDÓ, R. M.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, ID 1486, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01486.

HE, X.; XIA, Q.; LIN, G.; FU, P. P. Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts are common toxicological biomarkers of pyrrolizidine alkaloid N-oxides. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 984-991, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2017.09.001>.

HE, X.; XIA, Q.; WU, Q.; TOLLESON, W. H.; LIN, G.; FU, P. P. Primary and secondary pyrrolic metabolites of pyrrolizidine alkaloids form DNA adducts in human A549 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 54, p. 286-294, 2019. doi: 10.1016/j.tiv.2018.10.009.

HE, F., ANTONUCCI, L., YAMACHIKA, S., ZHANG, Z., TANIGUCHI, K., UMEMURA, A.; HATZIVASSILIOU, G.; ROOSE-GIRMA, M.; CAMPOS, M. R.; MOLINA, D.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J.; SUN, B.; KARIN, M. NRF2 activates growth factor genes and downstream akt signaling to induce mouse and human hepatomegaly. **Journal of Hepatology**, v. 76, n. 6, p. 1182-1195, 2020. doi:10.1016/j.jhep.2020.01.023.

HONORIO J. E. R.; SOARES, P. M.; MELO, C. L.; ARRUDA FILHO, A. C. V.; SENA FILHO, J. G.; BARBOSA FILHO, J. M.; SOUSA, F. C. F.; FONTELES, M. M. F.; LEAL, L. K. A.; QUEIROZ, M. G. R.; VASCONCELOS, S. M. M. Pharmacological activity of monocrotalina isolated from plants of the Genus *Crotalaria*. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia - Journal of Pharmacognosy. v. 20, p. 453-458, 2010. doi:10.1590/S0102-695X2010000300025.

JANK, B.; RATH, J. The risk of pyrrolizidine alkaloids in human food and animal feed. **Trends in Plant Science**, v. 22, p. 191-193, 2017. doi: 10.1016/j.tplants.2017.01.002.

JEZIOZEK, M.; DAMIANAKOS, H.; KAWIAK, A.; LAUDY, A. E.; ZAKRZEWSKA, K.; SYKLOWSKA, B. K.; CHINOU, I.; PIETROSIUK, A. Bioactive Rinderol and Cynoglosol Isolated from *Cynoglossum columnae* Ten. in vitro Root Culture. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 446-452, 2019. doi:10.1016/j.indcrop.2019.04.046.

JIA, Z.; TIAN, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. **Desalination**. v. 2, p. 423-429, 2009. doi: 10.1016/j.desal.2008.09.004.

KEMPF, M.; REINHARD, A.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids (PA) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 54, p. 158-168, 2010. doi: 10.1002/mnfr.200900529.

LEHMANN, N.; DITTLER, I.; LÄMSÄ, M.; RITALA, A.; RISCHER, H.; EIBL, D.; “Disposable bioreactors for cultivation of plant cell cultures,” in: Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology (Dordrecht: Springer Netherlands), p. 17-46, 2014. doi: 10.1007/978-94-017-9223-3_2.

MARTINEZ, S. T.; SANTOS, A. P.; PINTO, A. C. A determinação estrutural do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina: Exemplo dos desafios da química de produtos naturais até os anos sessenta do século XX. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 300-311, 2013. doi: 10.5935/1984-6835.20130028.

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 Ethnopharmacology**, v. 113, p. 457-470, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2007.07.006

MEDINA-BOLIVAR, L. F.; YANG, T. (2017). Inventors; Arkansas State University Jonesboro; assignee. method to increase the yield of products in plant material. EP2735609; US9598707; ES2644113; CA2834646; DK2735609; EP2735609; EP2735609.

MEAGHER, R. L. J.; WATROUS, K. M.; FLEISCHER, S. J. Westbrook, Documenting Potential Sunn Hemp (*Crotalaria juncea* L.) (Fabaceae) Pollinators in Florida. **Environmental Entomology**, v. 48, p. 343-350, 2019. doi:10.1093/ee/nvy190.

MEDEIROS, V. M. T.; RIET-CORREA, I. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DANTAS A. F. M.; TABOSA I. M.; VASCONCELOS J. S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Eqüídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, 2004, p.132-143.

McGEHEE, D. L.; ALIMOHAMMAD, M.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Carbon-based nanomaterials as stimulators of production of pharmaceutically active alkaloids in cell culture of *Catharanthus roseus*. **Nanotechnology**, v. 30, ID 275102, 2019.

MUKHERJEE, E.; GANTALT, S.; KUNDU, S.; SARKAR, S.; BHATTACHARYYA, S. Biotechnological interventions on the genus Rauwolfia: recent trends and imminent prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, 2019 p. 7325-7354. DOI: 10.1007/s00253-019-10035-6.

MOURA, G. A. Isolamento e avaliação de atividade nematicida de alcaloides pirrolizidínicos obtidos de *Crotalaria retusa*. UFV. 2018 (Dissertação de Mestrado).

NESTER, E. W. Agrobacterium: Nature's genetic engineer. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 730, 2015. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>.

NOBRE, V. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M.; TABOSA, I. M.; VASCONSELOS, J. S. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. **Toxicon**, v. 45, p. 347-352, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.11.005>.

OKETCH-RABAH, H. A.; ROE, A. L.; RIDER, C. V.; BONKOVSKY, H. L.; GIANCASPRO, G. I.; NAVARRO, V.; PAINE, M. F.; BETZ, J. M.; MARLES, R. J.;

CASPER, S.; GURLEY, B.; JORDAN, S. A.; HE, K.; KAPOOR, M. P.; RAO, T. P.; SHERKER, A. H.; FONTANA, R. J.; ROSSI, S.; VUPPALANCHI, R.; SEEFF, L. B.; STOLZ, A.; AHMAD, J.; KOH, C.; SERRANO, J.; DOG, T. L.; KO, R. United States Pharmacopeia (USP) Comprehensive Review of the Hepatotoxicity of Green Tea Extracts. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 386-402, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.008>.

OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, T. M. Novel alkaloid isolated from *Crotalaria paulina* and identified by NMR and DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1152, p. 337-343, 2017.

OLIVEIRA, R. P.; DEMUNER, A. J.; PARMA, M. G.; BARBOSA, L. C. A.; ALVARENGA, E. S.; GUIMARAES, L. M.; AGUIAR, A. Experimental and theoretical studies on the characterization of monocrotaline by infrared and Raman spectroscopies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1135, p. 228-233, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.01.050>.

PACHECO, J. S.; SILVA-LÓPEZ, R. E. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**, v. 5, 2010, p. 43-52.

QUEIROZ, G. R.; RIBEIRO, R. C. L.; FLAIBAN, K. K. M. C.; RODRIGUES, A. P. F.; BRACARENSE, L.; LISBÔA, J. A. N. Spontaneous *Crotalaria incana* poisoning in cattle in the state of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 823-832, 2013. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p823>.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 28, p. 703-709, 2004.

ROBERTSON, J.; STEVENS, K. Pyrrolizidine alkaloids: occurrence, biology, and chemical synthesis. **Natural Product Report**, v. 34, p. 62-89, 2017. doi:10.1039/c5np00076a.

ROBINS, D. J. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. **Chemical Society Reviews**, v. 18, p. 375-408, 1989. <https://doi.org/10.1039/CS9891800375>.

ROCKINGER, A.; FLORES, A. S.; RENNER, S. S. Clock-dated phylogeny for 48% of the 700 species of *Crotalaria* (Fabaceae-Papilionoideae) resolves sections worldwide and implies conserved flower and leaf traits throughout its pantropical range. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p. 61-75, 2017. doi: 10.1186/s12862-017-0903-5.

SANTANA, G. S. M.; DIAS, A. C. R.; FERREIRA, J. C. A.; SCHWENGBER, R. P.; BALDISERA, S. S. Reproduction of *Pratylenchus zae* and *P. brachyurus* in Cover Crops. **Revista Caatinga**, v. 32, p. 295-301, 2019. doi:10.1590/1983-21252019v32n201rc.

SAIMAN, M. Z.; MIETTINEN, K.; MUSTAFA, N. R.; CHOI, Y. H.; VERPOORT, R.; SCHULTE, A. E. Metabolic alteration of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures overexpressing geraniol synthase in the plastids or cytosol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (PCTOC), v. 134, 2018 p. 41-53.

SCHRAMM, S.; KOHLER, N.; ROZHON, W. Pyrrolizidine alkaloids: Biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. **Molecules**, v. 24, ID 498, 2019. doi:10.3390/molecules24030498.

SCHRENK, D. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, ID 110938, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110938>.

SILVA, A. C.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology**, v. 20, p. 381-388, 2016.

SILVA, C. M.; BOLZAN, A. B.; HEINZMANN, B. M. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio* species. **Química Nova**, v. 29, p. 1047-1053, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500026>.

SINAN, K. I.; SAFTIC, L.; PERSURIC, Z.; PAVELIC, S. K.; ETIENNE, O. K.; PICOT-ALLAIN, M. C. N.; MAHOMOODALLY, M. F.; ZENGIN, G. A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem

barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 101-108, 2020. doi:10.1016/j.sajb.2019.10.019.

SUBAEDA, S.; ALADIN, A. 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. doi: 10.1016/j.aaspro.2016.02.114.

SUT, S.; DALL'ACQUA, S.; SINÁ, K. I.; BENE, K.; KUMAR, G.; MAHOMOODALLY, M. F.; PICOT-ALLAIN, C.; ZENGIN, G. *Cola caricifolia* (G. Don) K. Schum and *Crotalaria retusa* L. from Ivory Coast as sources of bioactive constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 147, ID 112246, 2020.

TAMARIZ, J.; BURGUEÑO-TAPIA, E.; VÁZQUEZ, M. A.; DELGADO, F. In: The Alkaloids: Chemistry and Biology; Knölker, H. J., Ed.; **Academic Press**, 2018; Vol. 80, pp 1–314.

TARAKEMEH, A.; AZIZI, M.; ROWSHAN, V.; SALEHI, H.; SPINA, R.; DUPIRE, F.; AROUIE H.; MATTAR, D. L. Screening of Amaryllidaceae alkaloids in bulbs and tissue cultures of *Narcissus papyraceus* and four varieties of *N. tazetta*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 230-237, 2019.

THIYAGARAJAN, M.; VENKATACHALAM, P. Large scale in vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 111-117, 2012. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.10.037.

THODEM, T. C.; BOPPRE, M.; HALLMANN, J. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant- parasitic and free- living nematodes. **Pest Management Science**, v. 65, p. 823-830, 2009. <https://doi.org/10.1002/ps.1764>.

TIMLER, C.; ALVAREZ, S.; DECLERCK, F.; REMANS, R.; RANERI, J.; CARMONA, N. E.; MASHINGAIDZEA, N.; CHATTERJEEA, S. A.; CHIANGA, T. W.; TERMOTE, C.; YANGE, R.; DESCHEEMAERK, K.; BROUWERG, I. D.; KENNEDY, G.; TITTONELL, P. A.; GROOT, J. C. J. Exploring solution spaces for nutrition-sensitive

agriculture in Kenya and Vietnam. **Agricultural Systems**, v. 180, ID 102774, 2020. doi:10.1016/j.agry.2019.102774.

WANG, Z.; KANG, H.; JI, H.; YANG, Y.; LIU, T.; CAO, Z.; MORAHAN, Z.; WANG, Z. Proteomic characterization of the possible molecular targets of pyrrolizidine alkaloid isoline-induced hepatotoxicity. **Environment Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 608-617, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.06.013>.

XIE, X.; ZHU, D.; ZHANG, W.; HUAI, W.; WANG, K.; HUANG, X.; ZHOU, L.; FAN, H. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of four flavonoids in *Crotalaria sessiliflora* L. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 632-642, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.032>.

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, 2020 p. 167-174.

ZHANG, W.; HUAI, W.; ZHANG, Y.; SHEN, J.; TANG, X.; XIE, X.; WANG, K.; FAN, H. Ultra-Performance Liquid Chromatography Hyphenated with Quadrupole- 23 Orbitrap Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Necine-Core-Structure Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria sessiflora* L. without all corresponding Standards. *Phytochemical Analysis*. v. 28, n. 5, p. 365-373, 2017. doi: 10.1002/pca.2683.

ZHU, L.; WANG, Z.; WONG, L.; HE, Y.; ZHAO, Z.; YE, Y.; FU, P. T.; LIN, G. Contamination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in retail honey in China. **Food Control**, v. 85, p. 484-494, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.026>.

ZIEGLER, J.; FACCHINI P. J. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 735-769, 2008. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730.