

Extratos de espécies de *Crotalaria* e seu potencial no controle do nematoide de cisto

EXPOSITO, L.¹; LOIOLA, G.²; POLISELI, C.³; SCUPINARI, T.⁴; VERONEZZI, G.⁵; DIAS, W.P.⁶; HOFFMANN-CAMPO, C.B.⁶; LOPES, I. de O.N.⁶; NUNES, E.O.⁶

¹ UTFPR, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, lisaexposito@hotmail.com; ² UNIFIL, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR; ³ UEM, Bolsista Embrapa-Bayer, Maringá, PR; ⁴ UEL, Londrina, PR; ⁵ Laboratório de Ecologia Química, Embrapa Soja; ⁶ Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

Introdução

No Brasil, os danos causados por nematoides fitoparasitas é um dos fatores determinantes na perda significativa de produtividade (Goulart, 2008). Entre as espécies mais comuns de fitonematoides associados à cultura da soja estão: *Heterodera glycines* (nematoide do cisto); *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (nematoides de galhas); *Pratylenchus brachyurus* (nematoide das lesões radiculares) (Amorim et al., 2016). A rotação de culturas e o uso de plantas de adubação verde, como plantas do gênero *Crotalaria*, que apresentam efeitos antagonistas a fitonematoides, estão entre as melhores alternativas para o controle de populações desses fitoparasitas (Silveira; Rava, 2004; Lemes et al., 2018). O antagonismo apresentado por plantas deste gênero sobre essas formas infestantes provém de seus efeitos nematicidas e/ou nematostáticos, que são atribuídos aos metabólitos secundários presentes na composição destas plantas, em especial ao alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (Cunha et al., 2003; Gardiano et al., 2010). A monocrotalina (MCT) foi o primeiro alcaloide isolado de plantas do gênero *Crotalaria*, sendo considerada uma substância tóxica principalmente a animais vertebrados. Existem diversos relatos de intoxicação de ruminantes após a ingestão de plantas deste gênero, de acordo com Martinez et al. (2013).

O presente trabalho determinou a presença e o teor de MCT em plantas das espécies *Crotalaria spectabilis*, *C. ochroleuca* e *C. juncea*, após extração etanólica, por meio do desenvolvimento de uma metodologia de alta resolução. Além disso, são apresentados os resultados de estudos das ações nematostática e nematicida de extratos etanólicos dessas plantas sobre o fitonematoide *H. glycines*, por meio de bioensaios de dose-resposta. São também discutidas as relações entre os níveis de MCT nas plantas e a resposta dos nematoides à exposição aos extratos.

Material e Métodos

Amostras Vegetais

Foram utilizadas três espécies de *Crotalaria*: *C. juncea*, *C. ochroleuca* e *C. spectabilis*, cultivadas em campo, na fazenda experimental da Embrapa Soja, Londrina, PR (23° 11' 44" S e 51° 10' 35" O, 598 m de altitude). Foram utilizadas todas as folhas sadias de várias plantas coletadas no estágio de floração.

Obtenção dos extratos: As folhas de *Crotalaria* foram secas em estufa a 40°C, trituradas em liquidificador industrial até a obtenção de pó fino. Uma alíquota de 50 g do material em pó foi submetida à turboextração em solução de etanol/água (80:20 v/v) no volume de 1L, seguida de maceração. Durante a maceração, essa suspensão foi mantida por sete dias, protegidas da luz, com homogeneização manual diária. A suspensão foi filtrada e centrifugada sob refrigeração (Sorvall® - Legend X1R) a 4°C, a 5500 rpm (3314xg RCF), durante 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em Whatmann® (Ø=240mm), e submetido ao Rotavapor R124-BÜCHI®, 90 rpm e T= 43°C, até completa evaporação da fração alcoólica. Os extratos foram mantidos em geladeira a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento do uso. Parte do extrato foi reservado para fins analíticos.

Suscetibilidade de *H. glycines* aos extratos de *Crotalaria*

Foi utilizado como organismo-teste o nematoide *Heterodera glycines*, obtido da coleção do Laboratório de Nematologia da Embrapa Soja. O inóculo puro foi multiplicado em plantas de soja (cultivar suscetível). Os ovos foram extraídos de acordo com o método proposto por Dias et al. (1998), e colocados em câmaras de eclosão, para que os juvenis (J2) fossem obtidos segundo o método de Rios (1990).

Teste *in vitro*: Para o extrato de cada uma das espécies, o experimento foi conduzido em três repetições para cada extrato etanólico. Cada bateria de ensaio consistiu em expor alíquotas de J2 ($\cong 100$ indivíduos.mL⁻¹) ao extrato, nas concentrações: 0,00; 1,56; 3,12; 6,25; 9,37 e 12,50 mg.mL⁻¹, a um volume final de 4mL. As amostras foram avaliadas após dois momentos:

Exposição (24h a.e.): Os juvenis foram expostos ao extrato e incubados por 24h, a 25°C e ao abrigo da luz. Após esse período a mobilidade dos mesmos foi avaliada (quantificação de indivíduos móveis/imóveis em câmara de Peter). Na sequência, as amostras foram filtradas em membrana Millipore® ($\varnothing=0,45 \mu\text{m}$) e submetidas ao ensaio de recuperação.

Recuperação (24h a.e.+24h a.r.): O material retido no filtro (contendo os juvenis) foram ressuspensos em água destilada estéril, no mesmo volume, e mantidos sob as mesmas condições de incubação do ensaio de exposição. Após 24 horas da ressuspensão, os nematoides foram novamente quantificados em câmara de Peter, com o auxílio do corante vital azul do Nilo (8,0 %), e os indivíduos sem mobilidade e que absorveram o corante foram considerados mortos.

Tratamento estatístico: As respostas do nematoide aos extratos foram ajustadas ao modelo Weibull-1 (Ritz, 2010). Na parametrização adotada, esse modelo corresponde à distribuição de probabilidade exponencial, com função de ligação log-log, que pode ser representada como , em que: é uma concentração do extrato, o parâmetro é proporcional à taxa de variação na resposta do nematoide a um extrato na concentração definida pelo parâmetro , que é o ponto de inflexão da função . Para cada modelo, os parâmetros e , assim como a dose letal a 50% dos indivíduos (DL50), foram estimados utilizando-se o pacote drc de Ritz et al. (2015), para o ambiente de programação R.

O paralelismo entre duas curvas de respostas de diferentes espécies de *Crotalaria* foi verificado pelo teste de Student, considerando-se a hipótese de igualdade entre os valores de b . Para isso, assumiu-se heterogeneidade de variâncias e graus de liberdade igual a , em que: é o número de observações utilizados na estimativa de cada modelo. Em caso de evidência de paralelismo, foi também calculada a potência relativa entre as DL50 para *H. glycinis*, considerando-se o extrato de *C. spectabilis* como substância padrão.

Identificação e quantificação de monocrotalina

Para análise cromatográfica e de espectrometria de massas, os extratos etanólicos (EtOH 80:20 v/v) foram analisados no equipamento *Autopurify system* Waters®, no modo analítico constituído de HPLC, detecção por Arranjo de Diodos (PDA - 2998) na faixa $\lambda= 190 - 400\text{nm}$, e de massas Quadrupolo

Dalton (QDa[®]), na faixa de massa: 50 –1250 Da, CV = 15 V, ESI (+); coluna C18 Xbridge[®] (4,6 mm x 100 mm: 5,0 μm) de fase reversa, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e T= 20°C. O sistema de solventes utilizados foi: Fase A (ACN/H₂O, 10:90, v/v + NH₄OH 0,1%) e Fase B (ACN + NH₄OH 0,1%), em modo gradiente: 100% de (A) a 66,7% de (B) em 55 minutos, com retorno à condição inicial em 10 minutos. A identificação foi feita por meio de detecção em PDA e QDa, a quantificação pelo cromatograma obtido no modo PDA e confirmação efetuada pela adição de padrão na amostra e pela observação da relação m/z do composto.

Ensaio de calibração: As soluções padrão foram preparadas em fase móvel (Fase A) nas concentrações: 0; 1; 2,5; 5; 10; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva de calibração foi obtida por regressão linear, usando a altura do pico do padrão como relação da sua concentração. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9997, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram de 0,55 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os resultados do teste de suscetibilidade de *H. glycines* aos extratos etanólicos das espécies de *Crotalaria* investigadas, onde foi avaliado o efeito dose-resposta na imobilização: ações nematostática (24 h a.e) e nematicida (24h a.e.+ 24H a.r.). Não foi possível obter estimativas válidas dos parâmetros de f, que relacionassem as concentrações do extrato de *C. juncea* à ação nematostática (24h a.e.). O mesmo observou-se em relação aos extratos de *C. juncea* e de *C. ochroleuca* na ação nematicida (24h a.e.+24h a.r.). Embora tenha-se obtido uma relação dose-resposta válida para a ação nematicida do extrato de *C. spectabilis*, a ação nematicida foi evidenciada somente a partir da dosagem 9,37 mg.mL^{-1} .

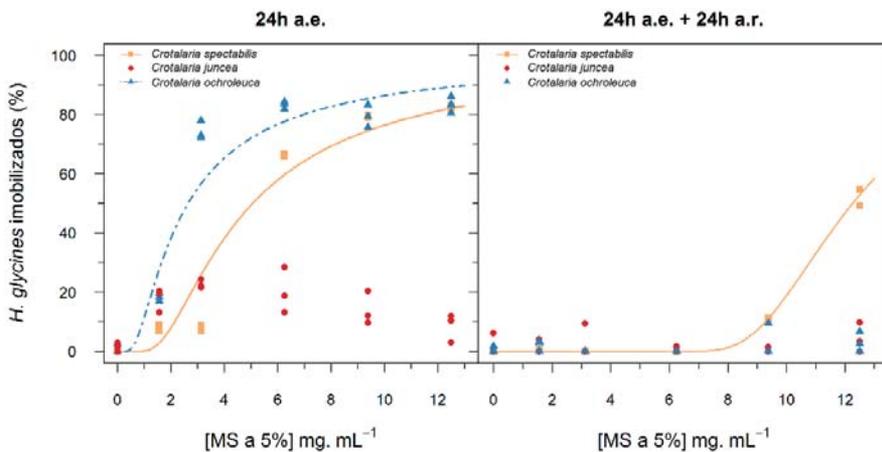


Figura 1. Efeito dose-resposta do nematoide *H. glycines* aos extratos etanólicos de *C. spectabilis*, *C. juncea* e *C. ochroleuca* após os ensaios de exposição e de recuperação.

O teste de paralelismo para as curvas do efeito nematostático de *C. ochroleuca* e *C. spectabilis* foi aceito, indicando que o comportamento na imobilização do nematoide foi similar para ambas espécies. No entanto, o valor da potência relativa indicou que a equivalência de doses entre os extratos testados nas mesmas condições foi de 1,92; isto é, foi necessário aproximadamente o dobro da dose de *C. spectabilis* para se obter a mesma efetividade nematostática de *C. ochroleuca* na DL50.

A Tabela 1 apresenta as concentrações de MCT nas folhas ($\mu\text{g.g}^{-1}$) e na concentração máxima do extrato ao qual os nematoides foram submetidos ($12,5 \text{ mg MS.mL}^{-1}$). Os valores encontrados nas folhas foram próximos ao observado por Zhang et al. (2017), onde foi encontrado $30,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ de MCT em folhas de *C. sessiflora*. Ao contrário que tem sido atribuído pela literatura, o presente trabalho mostra que a MCT não foi isoladamente a substância responsável pelos efeitos nematostáticos ou nematicidas, visto que o maior efeito nematostático foi observado em indivíduos expostos ao extrato de *C. ochroleuca* que não apresentou esse composto **à níveis** quantificáveis pelo método desenvolvido. Por outro lado, o teor de MCT em *C. juncea*, a qual não apresentou qualquer efeito na imobilização de *H. glycines*, foi aproximadamente metade da quantidade encontrada em *C. spectabilis*.

Tabela 1. Concentrações de monocrotalina [MCT] nos extratos etanólicos de folhas de *Crotalaria*, representadas em Microgramas por grama de folha ($\mu\text{g. g}^{-1}$) e na concentração máxima testada dos extratos ($12,5 \text{ mg MS.mL}^{-1}$), em que MS=Massa Seca

	<i>Crotalaria</i>		
	<i>spectabilis</i>	<i>juncea</i>	<i>ochroleuca</i>
[MCT] em $\mu\text{g. g}^{-1}$	$64,05 \pm 6,39$	$28,20 \pm 0,91$	ND*
[MCT] em $12,5 \text{ mg MS.mL}^{-1}$	$0,80 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,01$	ND*
*LD= $0,55 \mu\text{g. g}^{-1}$; LQ= $1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$			

A detecção de MCT em PDA: (a) amostra de *C. spectabilis*, (c) padrão analítico; bem como a confirmação por massas - QDa: (b) amostra de *C. spectabilis*, e (d) padrão; estão representadas na Figura 2. As linhas vermelhas delimitam o intervalo correspondente ao tempo de retenção da MCT em amostra de extrato etanólico de *C. spectabilis* e em uma amostra de padrão analítico, no detector PDA. Na Figura 2c, a concentração de MCT é de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto na amostra (Fig. 2a) foi de cerca de $0,6405 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Observando o tempo de retenção no detector QDa no modo TIC para essas amostras verificou-se o mesmo espectro de massas $[M^+] = 326 \text{ m/z}$ nas figuras 2b (amostra) e 2d (padrão), o que confirma a identidade da substância.

A hipótese de que a MCT não é, ao menos isoladamente, a responsável pelo efeito nematocida tem sido corroborada por resultados ainda não publicados, onde ensaios de suscetibilidade de *H. glycines* a MCT (padrão Sigma®) foram realizados com até $[5 \text{ mg.mL}^{-1}]$, não mostrando nenhum efeito nematostático e/ou nematocida.

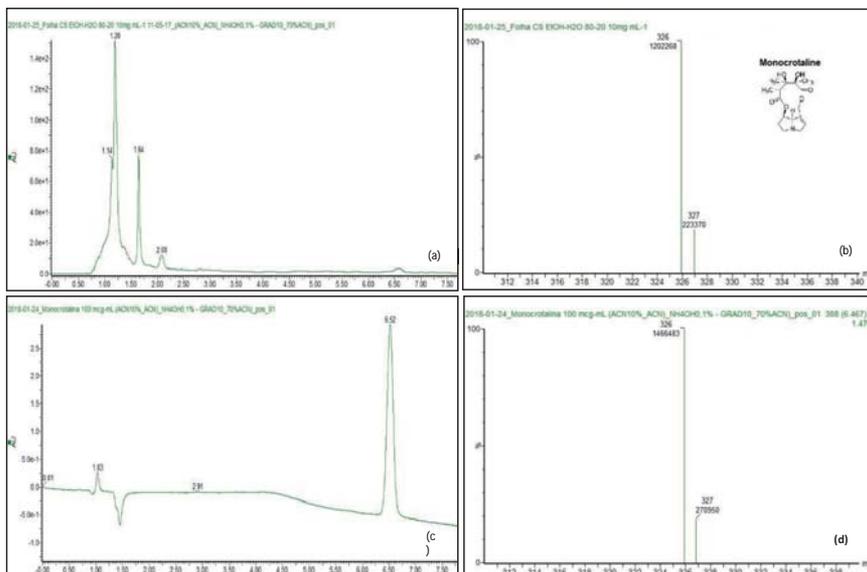


Figura 2. Cromatogramas em PDA (a,c) e espectros de massa QDa em ESI+ (b,d) obtidos de amostra de extrato etanólico de *Crotalaria spectabilis* (a,b) e padrão de monocrotalina [$100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] (b,d), em equipamento HPLC Autopurify System.

Conclusão

Nesse estudo foi possível determinar a concentração de monocrotalina, em três espécies de *Crotalaria*, bem como estabelecer os efeitos dos extratos etanólicos de suas plantas sobre o nematoide de cisto *Heterodera glycines*. Esses resultados reforçaram evidências de que a monocrotalina, ao menos isoladamente, não está relacionada diretamente ao efeito nematostático ou nematicida sobre a espécie *H. glycines*.

No entanto, aventou-se a possibilidade de investigar novas substâncias, uma vez que a *C. ochroleuca*, a qual não apresentou monocrotalina a níveis detectáveis, produziu elevado efeito nematostático.

Referências

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, 772 p.
- CAMARGO, G.; MIYASAKI, A. K.; COTRIM, G.; SCUPINARI, T.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; DIAS, W. P.; LOPES, I. de O. N.; NUNES, E. de O. Potencial de extrato de flores de *Crotalaria* no controle de nematoides da soja. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 12. 2017, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2017. p. 165-176.
- CUNHA, F. R.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P. Extratos vegetais com propriedades nematicidas e purificação do princípio ativo do extrato de *Leucaena leucocephala*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 438-441, 2003.
- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; KIIHL, R. A. S.; HIROMOTO, D.M.; ABDELNOOR, R.V. Quebra de resistência da cv. Hartwig por populações de campo de nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 971-974, 1998.
- GARDIANO, C. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; LOPES, E. A.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Atividade nematicida de extratos de sementes de espécies de *Crotalaria* sobre *Meloidogyne javanica*. **Trópica Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 1, p.3-7, 2010.
- GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219).
- LEMES, C. F. C.; MAZZETTI, V. C. G.; BERGHANN, S. C. T.; DEUNER, C. C.; BASSO, S. M. S. **Atividade nematicida de extratos de *Avena* spp. sobre a eclosão in vitro de juvenis de *Meloidogyne javanica***. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 41., Marília, 2018. **Summa Phytopathologica**, v. 44, supplement, 2018. Disponível em: <http://www.cpfito.net.br/cd/Resumos/Resumo41CPFito_0027.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2018.
- MARTINEZ, S. T.; SANTOS, A. P. B.; 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, n. 2, p. 300-311, 2013.
- RIOS, C. M. D. **Quantificação da patogenicidade de *Meloidogyne incognita***. 1990. 75 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- RITZ, C. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 220-229, 2010. DOI: 10.1002/etc.7.
- RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLoS One**, v. 10, n.12, e0146021, 2015.
- SILVEIRA, P. M. da; RAVA, C. A. **Utilização de crotalária no controle de nematóides da raiz do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 2 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 74).
- ZHANG, W., HUAI, W., ZHANG, Y., SHEN, J., TANG, X., XIE, X., Wang, K. and FAN, H. Ultra-performance liquid chromatography hyphenated with quadrupole-orbitrap mass spectrometry for simultaneous determination of necine-core-structure pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all corresponding standard. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 365-373, 2017. DOI: 10.1002/pca.2683.