

DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES, LECTINA E TOXICIDADE SOB NÁUPLIOS DE *Artemia* sp. DO EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE *Crotalaria* *ochroleuca*

RESUMO

O gênero *Crotalaria*, pertencente a família Leguminosae, é utilizado principalmente por agricultores para fins de adubação e controle de fitonematóides, sendo a *Crotalaria ochroleuca*, uma das espécies mais utilizadas. Porém, essas plantas podem ser tóxicas tanto para animais quanto para os seres humanos, seja devido a presença de alcaloides ou de outras moléculas, como as lectinas. O presente trabalho teve como objetivo determinar quantitativamente alcaloides e proteínas em sementes de *C. ochroleuca*, identificar preliminarmente a presença de lectina e realizar um ensaio de toxicidade. O teor de alcaloides totais foi determinado por volumetria, a concentração proteica do extrato foi determinada pelo método de Bradford, a identificação da lectina foi realizada através da atividade hemaglutinante e o ensaio de toxicidade foi realizado sob náuplios de *Artemia* sp. As sementes de *C. ochroleuca* apresentaram um teor de 2,01% e 2,18 mg.mL⁻¹ de alcaloides e proteínas totais, respectivamente. A atividade hemaglutinante resultou em 1.024 U.H.mL⁻¹. O extrato aquoso das sementes demonstrou-se tóxico contra os crustáceos testados, uma vez que apresentou LC₅₀ de 500 µg.mL⁻¹. Portanto, foi possível quantificar o teor de alcaloides e proteínas totais de sementes de *C. ochroleuca*, identificar a presença de uma possível lectina, bem como verificar o potencial tóxico sob *Artemia* sp. Ademais, são necessários mais estudos para identificação do agente tóxico, seja uma lectina, alcaloide ou um possível sinergismo entre os dois. Posteriormente, estudos de caracterização molecular e dos mecanismos de ação poderão colaborar para o desenvolvimento de algum produto com aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: *Crotalaria ochroleuca*. Alcaloides. Lectinas. *Artemia* sp. Toxicidade.

DETERMINATION OF ALKALOIDS, LECTIN AND TOXICITY IN *Artemia* sp. NAUPLII OF THE WATER EXTRACT OF SEEDS OF *Crotalaria ochroleuca*

ABSTRACT

The *Crotalaria* genus, belonging to the Leguminosae family, is used mainly by farmers for fertilization and phytomelid control, with *Crotalaria ochroleuca* being one of the most used species. However, these plants can be toxic to both animals and humans, whether due to the presence of alkaloids or other molecules, such as lectins. The present study aimed to quantitatively determine alkaloids and proteins in *C. ochroleuca* seeds, preliminarily identify the presence of lectin and perform a toxicity test. The content of total alkaloids was determined by volumetry, the

protein concentration of the extract was determined by the Bradford method, the identification of the lectin was carried out through the hemagglutinating activity and the toxicity test was carried out under *Artemia* sp nauplii. The seeds of *C. ochroleuca* had a content of 2.01% and 2.18 mg.mL⁻¹ of alkaloids and total proteins, respectively. The hemagglutinating activity resulted in 1,024 U.H.mL⁻¹. The aqueous extract of the seeds proved to be toxic against the tested crustaceans, since it presented LC₅₀ of 500 µg.mL⁻¹. Therefore, it was possible to quantify the content of alkaloids and total proteins of *C. ochroleuca* seeds, to identify the presence of a possible lectin, as well as to verify the toxic potential under *Artemia* sp. In addition, further studies are needed to identify the toxic agent, be it a lectin, alkaloid or a possible synergism between the two. Subsequently, studies of molecular characterization and mechanisms of action may collaborate for the development of some product with biotechnological application.

Keywords: *Crotalaria ochroleuca*. Alkaloids. Lectins. *Artemia* sp. Toxicity.

1. INTRODUÇÃO

As plantas do gênero *Crotalaria* pertencem a família Leguminosae, caracterizam-se por apresentar porte herbáceo ou arbustivo, são pouco ramificadas e eretas, ocorrem principalmente em habitats abertos de baixa a média altitude, apresentam flores papiloides típicas, compostas por pétalas padrão, asa e quilha de coloração amarela, às vezes com manchas vermelhas ou acastanhadas. São plantas com alta adaptação em regiões tropicais e apresentam rápido crescimento (SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2010).

O nome *Crotalaria* advém do barulho das vagens secas com as sementes quando são sacudidas pelo vento, que se assemelha com o som emitido pelo guizo de cobras cascavéis (*Crotalus* sp.), sendo popularmente conhecidas também como guizo-de-cascavel e xique-xique (MARTINEZ et al., 2013).

Um das espécies de *Crotalaria* mais usada pelos agricultores é a *Crotalaria ochroleuca*, utilizada principalmente na

adubação verde por ter um potencial de produção de biomassa mesmo em solos pobres e por sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio, além de colaborar com a supressão de ervas daninhas (BOTINI et al., 2015) e reduzir a população de fitonematoides, por atuarem como antagonistas

desses organismos (COTRIM et al., 2019), dentre eles estão o *Pratylenchus brachyurus*, que causam lesões reticulares em plantas (TOEBE et al., 2018) e o *Heterodera glycines*, considerado um dos principais problemas fitossanitários da cultura de soja (MATSUO et al., 2012).

Apesar do amplo uso de espécies de *Crotalaria* na agricultura, algumas podem ser tóxicas para animais, principalmente para caprinos e bovinos, devido o seu alto teor de alcaloides, que podem causar efeitos tanto hepatotóxicos quanto neurotóxicos (HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010; PIRES et al., 2015).

Os alcaloides são compostos formados a partir do metabolismo secundário, principalmente de plantas e são taxonomicamente e quimicamente diversificados,

apresentando uma significativa variedade de estruturas químicas. Essas moléculas apresentam um nitrogênio como heteroátomo de cadeias carbônicas cíclicas, normalmente se apresentam como estruturas cristalinas que na presença de ácidos formam sais, sendo formados por átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, porém, podem conter átomos de oxigênio em sua estrutura (AMIRKIA; HEINRICH, 2014; SILVA et al., 2015).

Os alcaloides pirrolizidínicos (APs) compreendem um dos alcaloides mais abundantes em plantas, são compostos por ésteres de aminoálcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos), que podem se apresentar na forma de mono, di e diésteres cíclicos (LUCENA et al., 2010). As necinas caracterizam-se por apresentar um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como “cabeça de ponte”, um grupamento hidroximetila em C1 e uma hidroxila em C7 (SANDINI et al., 2013). Os APs podem apresentar a necina insaturada entre os carbonos C1 e C2, sendo esta característica um pré-requisito para a sua toxicidade aguda e crônica. Os APs que possuem a necina saturada não são tóxicos aos mamíferos (SILVA et al., 2006).

Dentre os APs está a monocrotalina, o primeiro alcaloide isolado de plantas do gênero *Crotalaria*. Ela é ativamente oxidada *in vivo* pelo citocromo P450 no fígado, formando intermediários altamente reativos do tipo pirrólicos que são responsáveis pela ligação cruzada do DNA-DNA e DNA proteína, causando danos moleculares (HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010; POLONIO et al., 2014).

Além dos alcaloides, a toxicidade das plantas, sobretudo das sementes, pode ser devido

a presença de moléculas proteicas, sobretudo de biomoléculas como as lectinas (STILLMARK, 1888; MAŁAJOWICZ; KUŚMIREK, 2019), que são proteínas de origem não imunológica com capacidade de se ligar de forma reversível e específica a glicídios e/ou glicoconjugados sem, portanto, modificá-los bioquimicamente (FIORENTINO et al., 2018; CAVADA et al., 2020a), como por exemplo a lectina PpaL, isolada de sementes de *Parkia panurensis* (CAVADA et al., 2020b), e, a CoxyL, isolada de sementes da *Canavalia oxyphylla* (SANTIAGO et al., 2014).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em seres unicelulares, animais e em vegetais. Lectinas de plantas, sobretudo de leguminosas, dominam o cenário da lectinologia por serem amplamente distribuídas na natureza (MOURA et al., 2006; MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018). São detectadas através do ensaio de hemaglutinação, na qual a lectina se liga a carboidratos da superfície de eritrócitos através de seus sítios de ligação, possibilitando uma aglutinação visível de forma macroscópica (OLIVEIRA et al., 2013; PINEDO et al., 2015).

Dados quantitativos de alcaloides em espécies de *Crotalaria* são escassos na literatura, sobretudo de *C. ochroleuca*, assim como a identificação de lectinas e principalmente ensaios de toxicidade, na qual garante o uso seguro dessa planta, tanta para animais quanto para os seres humanos. Além disso, estudos de espécies pouco estudadas poderão colaborar para a valorização da mesma e evitar a sua extinção. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar quantitativamente alcaloides e proteínas totais em sementes de *C. ochroleuca*, realizar uma

identificação preliminar da presença de lectina e determinar a citotoxicidade sobre náuplios de *Artemia* sp.

2. METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no laboratório de Química Geral e no Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada (NUBEM) no Centro Universitário Inta (UNINTA), nos meses de agosto e setembro de 2019.

2.1 Sementes de *Crotalaria ochroleuca*

As sementes de *C. ochroleuca* foram coletadas na cidade de Alcântaras - CE, localizada na Mesorregião do Noroeste Cearense.

Para as análises, as sementes foram trituradas e peneiradas para obtenção de uma fina farinha.

2.2 Determinação de alcaloides totais

Os alcaloides totais foram determinados pelo método de Clarke (1970) e Harbore (1998), com modificações. Primeiramente pesou-se e transferiu 5 g da farinha da semente de *C. ochroleuca* para um erlenmeyer e adicionou-se 4 mL de hidróxido de amônia 40% e 50 mL de hexano. A solução foi colocada em agitador magnético por 30 minutos. O frasco foi tampado com papel alumínio. Após o processo de extração, separou-se a fase orgânica e adicionou-se ao resíduo, 2 mL de hidróxido de amônia 40% e 20 mL de hexano. Separou-se a fase etérea e repetiu o mesmo procedimento por mais três vezes. Em seguida, combinou-se os extratos etéreos e secou-se em cápsula de porcelana em

banho-maria a 50 °C. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de etanol absoluto e em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada a temperatura ambiente. Para a titulação utilizou-se três gotas de uma solução indicadora (vermelho de metila e azul de metileno). A solução amostra foi titulada com ácido clorídrico 0,01 M até a cor da solução mudar de verde-claro para cinza-azulado. O teor de alcaloides totais foi expresso em porcentagem segundo a fórmula:

$$TA = \frac{V \times 6,037 \times 0,1}{m}$$

Em que:

TA = teor de alcaloides totais expressos em acetonitina % (p/p);

V = volume de ácido clorídrico 0,01 M, em mililitros, consumido na titulação;

m = massa utilizada, em gramas.

2.3 Preparo da amostra para a quantificação das proteínas totais solúveis, determinação da atividade hemaglutinante e ensaio de toxicidade

Para a extração aquosa de proteínas totais, foi seguida a metodologia de Cavada et al. (2020b), na qual foi utilizado 0,4 g da farinha das sementes de *C. ochroleuca* na proporção de 1:10 (m:v) por 16 h. Decorrido o tempo, a solução foi centrifugada a 9.000 x g por 20 min a 4 °C, em seguida, foi colhido o sobrenadante (extrato bruto), para a quantificação de proteínas totais solúveis, atividade hemaglutinante e ensaio de toxicidade.

2.4 Proteínas totais solúveis

As proteínas totais solúveis foram determinadas através do método de Bradford (1976), com modificações. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 8 µL do extrato em triplicata.

Em seguida adicionou-se 200 μL do reagente de Bradford. Após 10 minutos foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas totais solúveis na amostra analisada foi determinada a partir da curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de BSA (Proteína do Soro Bovino). Os resultados foram expressos em mg.mL^{-1} .

2.5 Determinação da atividade hemaglutinante

A determinação da atividade hemaglutinante do extrato proteico foi realizada de acordo com Moreira e Perrone (1977), com adaptações. Para tanto, foi feita dupla diluição seriada do extrato (50 μL) em 150 mM de NaCl (50 μL) em placa de microtitulação. Posteriormente, em cada poço foram adicionados 50 μL de suspensão de eritrócitos de coelho à 2% nas condições nativas e tratadas enzimaticamente com tripsina e papaína. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min e mais 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, o resultado foi determinado macroscopicamente e expressa em título de Unidade de Hemaglutinação por mililitro (UH.mL^{-1}).

2.6 Ensaio de toxicidade sob náuplios de *Artemia* sp.

Foi escolhido o teste de toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp. por apresentar a vantagem de ser rápido, fácil de executar, versátil, de baixo custo, requer pequenas quantidades de amostra e é ainda um dos ensaios agudo-letal mais reproduzido e padronizado no meio científico (PIMENTEL et al., 2011). Apresenta uma boa correlação com distintas atividades biológicas, tais como, antiplasmódica (AMARANTE et al., 2011), antitumoral

(ARCANJO et al., 2012), citotoxicidade de pesticidas (VARÓ et al., 2002), entre outras aplicações, poupando muitas vezes a necessidade de testes caros ou em organismos mais complexos (*in vivo*) (HIROTA et al., 2012).

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982), com modificações. Primeiramente os cistos de *Artemia* sp. foram eclodidos em água do mar esterilizada na proporção de 1:10 (m/v), em temperatura ambiente, aeração constante e sob luz por 48 h, para obtenção dos náuplios.

Numa placa de 24 poços foi adicionado em cada poço (em triplicata) 1 mL de água do mar esterilizada, 10 náuplios e 1 mL do extrato, nas concentrações: 2,18, 1,09, 0,55 e 0,27 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. O controle negativo e positivo ambos correspondeu a três poços com água do mar e náuplios, sendo que apenas o positivo havia SDS (dodecilsulfato de sódio) a 10 mg.mL^{-1} . A quantidade de crustáceos mortos foi lida com 24 e 48 h com auxílio de uma lupa e logo após calculado os valores da LC_{50} do extrato, sendo classificado tóxico e atóxico quando a LC_{50} era menor ou maior que 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação de alcaloides totais

As sementes de *C. ochroleuca* apresentaram 2,01% de alcaloides totais. O resultado é semelhante com o de outras espécies de *Crotalaria* estudadas, como a *Crotalaria agatiflora*, *Crotalaria laburnifolia* e *Crotalaria axillaris* que apresentam teor de alcaloides totais de 1,88%, 1,91% e 2,88%, respectivamente

(ASRES, SPORER, WINK, 2004). A literatura aponta a identificação desse composto em diversas outras espécies, como a *Crotalaria incana* (LEAL et al., 2019), *Crotalaria spectabilis* (UBIALI et al., 2011), *Crotalaria pallida* (COGNI; TRIGO, 2016), *Crotalaria retusa* (NETO et al., 2016), *Crotalaria juncea* (PESSOA et al., 2013), *Crotalaria assamica* (CHENG et al. 2013) *Crotalaria álbida* (SUN et al., 2013) e a *Crotalaria sessiliflora* (TANG et al., 2017). Porém, estudos quantitativos de alcaloides ainda são escassos em muitas dessas espécies. Todavia, o gênero *Crotalaria* já é conhecido na literatura por ser rico em alcaloides pirrolizidínicos (AP), que são as principais toxinas derivadas de plantas que acometem humanos e animais (HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010), sendo a monocrotalina o principal AP encontrado e também o primeiro a ser isolado nas plantas desse gênero. Esses derivados são altamente reativos, são capazes de inibir a mitose, causando megalocitose e morte celular, além de necrose de hepatócitos quando ingeridos em altas doses (LUCENA et al. 2010; UBIALI et al., 2011).

3.2 Determinação da atividade hemaglutinante

Além dos alcaloides, outras moléculas proteicas como as lectinas, presentes principalmente em sementes, também podem apresentar propriedades tóxicas (STILLMARK, 1888; MAŁAJOWICZ; KUŚMIREK, 2019). As lectinas apresentam a capacidade de se ligar a carboidratos da superfície de células, tal capacidade possibilita que sejam detectadas através de testes de hemaglutinação com eritrócitos (FIORENTINO et al., 2018; CAVADA et al., 2020a).

O teste de atividade hemaglutinante realizado com o extrato aquoso de *C. ochroleuca* apresentou $1.024 \text{ U.H.mL}^{-1}$, podendo ser um indicativo da presença de lectina. Para confirmar se de fato há lectina são necessários outros testes, como por exemplo, aquecer o extrato a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h, tendo em vista que nessa temperatura, geralmente, as proteínas perdem sua estrutura tridimensional, conseqüentemente perdendo sua atividade (CAVALCANTI et al., 2010). Assim, se mesmo depois de aquecida a hemaglutinação prevalecer, pode-se inferir que a atividade era devido outra molécula e não por causa da presença de lectina.

Lectinas tem sido purificadas de várias espécies de *Crotalaria*, tais como a *C. spectabilis* (SALLES et al., 2014), *C. juncea* (ERSSON, 1977), *C. pallida* (REGO et al., 2002), *C. striata* (KHANG et al., 1990), *C. paulina* (PANDO et al., 2004). Assim aumentando a possibilidade de que a atividade hemaglutinação observada pode ser devido a presença de lectina. Porém, ensaios de toxicidade de lectinas são escassos nesse gênero.

Ademais, estudos de toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp. com sementes de plantas da família Leguminosae, detectou a presença de diversas lectinas com potencial tóxico, dentre essas lectinas estão a PpaL, CoxyL, ConA e ConBr, isoladas de sementes de *Parkia panurensis* (CAVADA et al., 2020b), *Canavalia oxyphylla* (SANTIAGO et al., 2014), *Canavalia ensiformis* e de *Canavalia brasiliensis* (ARRUDA et al., 2013), respectivamente.

3.3 Ensaio de toxicidade sobre náuplios de *Artemia* sp

Os resultados apontaram um potencial tóxico para o extrato aquoso das sementes de *C. ochroleuca*, pois o mesmo apresentou uma LC_{50} de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*), apresentada por extratos de plantas sobre náuplios de *Artemia*. Desde então, considera-se que quando os extratos apresentam LC_{50} acima ou abaixo de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estes são considerados atóxicos ou tóxicos, respectivamente. Tendo em vista que a LC_{50} é a concentração que causa a morte de 50% dos organismos-teste durante certo tempo de exposição (DAMATO; BARBIERI, 2011).

Por ter sido determinada em relação à concentração de proteína, a LC_{50} pode sugerir que a toxicidade é devido a presença de proteína, como por exemplos as lectinas. Tendo em vista que diversos trabalhos têm mostrado que essas proteínas apresentam potencial tóxico sob náuplios de *Artemias* como relatado acima. Entretanto, como foi observada a presença de alcaloides no extrato aquoso da farinha de semente de *Crotalaria*, então pode sugerir que a toxicidade também possa ser pela presença desses compostos. Ademais, segundo Peixoto e colaboradores (2015), a presença simultânea de dois ou mais compostos pode promover uma potencialização dos efeitos tóxicos de uma substância, desta forma, é provável também que a toxicidade observada nesse estudo seja devido ao sinergismo entre alcaloides e a possível lectina.

Vale ressaltar que a toxicidade comprovada do extrato aquoso das sementes de *C. ochroleuca* é condizente com outros estudos realizados com distintas espécies desse mesmo

gênero, em diferentes modelos de ensaio de toxicidade. Cheng e colaboradores (2013) estudaram os efeitos tóxicos em ratos do extrato aquoso de sementes de *C. assamica*, um dos fitoterápicos chineses contendo alcaloides da pirrolizidina. As sementes demonstraram serem tóxicas para os pulmões e para o fígado dos roedores. O possível mecanismo sugerido pelos autores para a toxicidade hepática é a formação de metabólitos de pirrol, formados a partir de APs.

A formação de pirróis, além de ser tóxica, também é carcinogênica, tanto para animais quanto para humanos, isso é possível porque essa molécula pode causar danos moleculares devido a capacidade de reagir com macromoléculas celulares formando adutos com a molécula de DNA, levando ao início de ação tóxica aguda ou crônica, causando efeitos mutagênicos nos cromossomos de mamíferos (SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2010; KEMPF et al., 2010).

Um estudo realizado por Leal e colaboradores (2019) demonstrou um potencial tóxico para a planta *C. incana*, na qual foi capaz de causar encefalopatia hepática em bovinos que se alimentaram desta planta. Uma análise da composição química por espectroscopia de ressonância magnética detectou a presença de dois principais alcaloides, o 1,2-desidropirrolizidina e o N-óxido, que poderiam ser os responsáveis pela toxicidade dessa espécie de *Crotalaria*.

Um estudo *in vivo* executado com suínos que se alimentaram de sementes de *C. spectabilis* apontou que doses diárias de 0,5 e 1,25 g/kg causaram fibrose hepática nesses animais e os sinais clínicos, caracterizados por depressão,

letargia, apatia, inapetência, vômito, mucosas ictericas ou pálidas, ascite, decúbito esternal, decúbito lateral com movimentos de pedalagem e convulsões, podem se apresentar com até 48 horas após o consumo dessa leguminosa, sendo letal após 60 horas. Os responsáveis pelo estudo também sugerem que a presença de APs nessas sementes pode ser a causa da intoxicação (UBIALI et al., 2011).

Os efeitos tóxicos de espécies de *Crotalaria* também foram estudados em equinos. Pessoa e colaboradores (2013) administraram sementes de *C. juncea* contendo 0,074% de alcaloides desidropirrolizidínicos (DHPAs) em três burros com 0,3, 0,6 e 1 g/kg de peso corporal diariamente por 365 dias. Não foram observados sinais clínicos e, nas biópsias hepáticas e pulmonares, a única lesão foi uma megalocitose hepática leve nos burros que ingeriram 0,6 e 1 g/kg/dia. O estudo também avaliou o efeito tóxico de sementes de *C. retusa* contendo 5,99% de monocrotalina em doses diárias de 0,025, 0,05 e 0,1 g/kg por 365 dias, ao final, os burros apresentaram megalocitose hepática moderada. Em contrapartida, doses de 5 g/kg a 1 g/kg por pelo menos 7 dias, causaram necrose hepática centrolobular difusa. Segundo os autores, a ocorrência de lesões pulmonares ou hepáticas se correlaciona com o tipo de DHPAs contidos nas sementes, na qual alguns podem causar doenças hepáticas e outras doenças pulmonares.

Além dessas espécies, sementes de *C. lanceolata* e de *C. pallida* podem causar diversos malefícios em frangos, como edema subcutâneo, ascite, hidropericárdio, vesícula biliar distendida, tumefação e degeneração vacuolar de hepatócitos, além de inapetência, penas com folhos e diarreia marrom. A toxicidade dessas

sementes nessas aves foi comprovada através de um ensaio *in vivo* realizado por Savaris e colaboradores (2019).

Ensaio de toxicidade, sobretudo sob náuplios de *Artemias* sp., são extremamente importantes por dois principais motivos, primeiro que esse é um dos ensaios agudo-letal de maior confiabilidade no meio científico, por sua padronização e reprodução (PIMENTEL et al., 2011). Além de possibilitar ajustar uma dose letal para ensaios de toxicidade mais complexos, usando organismos vertebrados mais desenvolvidos. Em segundo, estudos toxicológicos sobre a espécie de *C. ochroleuca* ainda são escassos na literatura, tendo em vista que essa espécie é frequentemente usada na agricultura na adubação, supressão de ervas daninha (BOTINI et al., 2015), além de reduzir a população de fitonematoides, como o *Pratylenchus brachyurus*, que causam lesões em plantas (TOEBE et al., 2018) e o *Heterodera glycines*, que afeta a cultura de soja (MATSUO et al., 2012). Assim, essa espécie pode oferecer algum tipo de risco, não só para os animais que por ventura se alimentarem dessa planta, mas também para os seres humanos.

4 CONCLUSÃO

Foi possível detectar e quantificar o teor de alcaloides e proteínas a partir de sementes de *C. ochroleuca*, bem como determinar a LC₅₀ para o extrato aquoso, na qual apresentou um potencial tóxico sobre náuplios de *Artemia* sp. O extrato também apresentou indícios de uma suposta lectina. Desta forma, são necessários mais estudos para comprovar se a toxicidade

dessa semente é devido a presença de alcaloides ou de lectina ou pelo sinergismo entre eles. Por fim, uma vez identificado qual molécula causa a toxicidade, a mesma será caracterizada e utilizada em estudos para a identificação e compreensão dos mecanismos desse efeito, possibilitando assim, o desenvolvimento de alguma aplicação biotecnológica com os achados.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431 – 434, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aa/v41n3/a15v41n3.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2019.
- AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. **Phytochemistry Letters**, v. 10, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187439001400113X>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- ARCANJO, D. D. R. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Braz. J. Biol.**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/bjb/v72n3/13.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2019.
- ARRUDA, F. V. S. et al. Toxicity and binding profile of lectins from the Genus *Canavalia* on brine shrimp. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/154542/>. Acesso em: 07 set. 2019.
- ASRES, K.; SPORER, F.; WINK, M. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 10, p. 915-930, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197804000912>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- BOTINI, N. et al. Germinação *in vitro* de *Crotalaria ochroleuca* em diferentes meios de cultura. VI Simpósio da Amazônia Meridional em Ciências Ambientais. **Scientific Electronic Archives**, v. 8, n. 3, 2015. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/71083918/217-658-1-pb>. Acesso em: 25 set. 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.
- CAVADA et al. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 159-165, 2020a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32184140/>. Acesso em: 03 set. 2019.
- CAVADA, B. S. et al. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex HC Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 845-855, 2020b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31739070/>. Acesso em: 10 ago. 2019.
- CAVALCANTI, M. T. et al. Avaliação da estabilidade térmica das proteínas das amêndoas da faveleira (*Cnidoculus phyllacanthus* (Mart) Pax. Et K. Hoffm). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.37-43, 2010. Disponível em: <http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev121/Art1215.pdf>. Acesso em: 04 set. 2019.
- CHENG, M. et al. Toxic effects of aqueous extract of *Crotalariae assamicae* semen in rats and possible mechanism in association with liver damage. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 38, n. 11, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010299/>. Acesso em: 25 ago. 2019.
- CLARKE, E. G. C. The forensic chemistry of alkaloids. In: **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**. Academic Press, 1970. p. 513-589. Disponível em: <file:///C:/Users/user/Downloads/clarke1970.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2019.
- COGNI, R.; TRIGO, J. R. Pyrrolizidine Alkaloids Negatively Affect a Generalist Herbivore Feeding on the Chemically Protected Legume *Crotalaria pallida*.

- Neotrop Entomol**, v. 45, n. 3, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26830432/>. Acesso em: 25 ago. 2019.
- COTRIM, M. F. et al. Studying the link between physiological performance of *Crotalaria ochroleuca* and the distribution of Ca, P, K and S in seeds with X-ray fluorescence. **PloS one**, v. 14, n. 9, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0222987>. Acesso em: 28 set. 2019.
- DAMATO, M.; BARBIERI, E. Determinação da toxicidade aguda de cloreto de amônia para uma espécie de peixe (*Hyphessobrycon callistus*) indicadora regional. **O mundo da saúde**, v. 35, n. 4, p. 401-407, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285675633_Determinacao_da_toxicidade_aguda_de_cloreto_de_amonia_para_uma_especie_de_peixe_Hyphessobrycon_callistus_indicadora_regional. Acesso em: 15 set. 2019.
- ERSSON, B. A phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 494, p. 51-60, 1977. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S005279577901349>. Acesso em: 04 set. 2019.
- FIORENTINO, M. A. et al. Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in placenta and lungs of Brucella abortus-bovine infected fetuses. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 1, p. 57-63, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5918125/>. Acesso em: 03 set. 2019.
- GOLDSTEIN, I. J. et al. A new α -galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 467, n. 2, p. 268-274, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986107004286>. Acesso em: 28 set. 2019.
- HARBORE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plan analysis**. Chapman and Hall. 3.ed. 1998.
- HIROTA, B. C. K. et al. Avaliação de toxicidade *in vitro*: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 13, n. 2, 2012. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/27834/19433>. Acesso em: 11 ago. 2019.
- HONÓRIO JUNIOR, J. E. R. et al. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 453-458, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v20n3/a25v20n3.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2019.
- KEMPF, M.; REINHARD, A.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 54, p. 158-168, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20013889/>. Acesso em: 20 set. 2019.
- KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; JOHAN, H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1033, n. 2, p. 210-213, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2306467/>. Acesso em: 04 set. 2019.
- LEAL, P. V. Hepatic Encephalopathy Secondary to Chronic Liver Lesions Caused by *Crotalaria incana* in a Bovine. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 2019. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/89439/52060>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- LUCENA, R. B. et al. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 5, p. 447-452, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v30n5/a13v30n5.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2019.
- MAŁAJOWICZ, J.; KUŚMIREK, S. Structure and properties of ricin—the toxic protein of Ricinus communis. **Postepy biochemii**, v. 65, n. 2, p. 103-108, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31642648/>. Acesso em: 29 ago. 2019.
- MARTINEZ, S. T.; DOS 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. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 2, p. 300-311, 2013. Disponível em: <http://static.sites.sbjq.org.br/rvq.sbjq.org.br/pdf/v5n2a14.pdf>. Acesso em: 28 set. 2019.
- MARTÍNEZ-ALARCÓN, D.; BLANCO-LABRA, A. & GARCÍA-GASCA, T. Expression of Lectins in Heterologous Systems. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 2, p. 616, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29466298/>. Acesso em: 27 set. 2019.
- MATSUO, E. et al. Avaliação de genótipos de soja em relação ao nematoide de cisto. **Bragantia**, v. 71, n. 2, p. 173-181, 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/brag/v71n2/aop_1350_12.pdf. Acesso em: 26 set. 2019.
- MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982. Disponível em: <https://www.thieme->

connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-971236. Acesso em: 15 set. 2019.

MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17020812/>. Acesso em: 30 ago. 2019.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purificação and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16659942/>. Acesso em: 10 ago. 2019.

NETO, T. S. N. et al. Activity of pyrrolizidine alkaloids against biofilm formation and *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 323–329, 2016. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S075333221630542X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 ago. 2019.

OLIVEIRA, A. S. et al. Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra* spp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2113-2117, 2017. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/aabc/v89n3s0/0001-3765-aabc-201720160150.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.

OLIVEIRA, W. R.; REGO, E. J. L.; RISTOW, P. C. L. V. B.; LIMA, S. T. C. Purificação e Atividade Hemaglutinante das Lectinas de Sementes de *Crotalaria spectabilis* R. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 351-354, 2013. Disponível em:
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/15860/0>. Acesso em: 15 set. 2019.

PANDO, L. A. et al. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **The protein journal**, v. 23, n. 7, p. 437-444, 2004. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15635935/>. Acesso em: 04 set. 2019.

PEIXOTO, M. S. et al. Modelagem do efeito ecotoxicológico de misturas de agrotóxicos em organismos aquáticos utilizando números fuzzy. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BIOMATEMÁTICA, 9, 2015, Botucatu. Anais. Botucatu: Sociedade Brasileira de Matemática Aplicada e Computacional, p. 1-3, 2015. Disponível em:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139199/1/2015AA079.pdf>. Acesso em: 18 set. 2019.

PESSOA, C. R. M. et al. Pulmonary and hepatic lesions caused by the dehydropyrrolizidine alkaloid-producing plants *Crotalaria juncea* and *Crotalaria retusa* in donkeys. **Toxicon**, v. 71, p. 113–120, 2013. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23726858/>. Acesso em: 25 ago. 2019.

PIMENTEL, M. F. et al. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/236159426_O_Uso_de_Artemia_sp_como_Organismo-Teste_para_Avaliacao_da_Toxicidade_das_Aguas_Residuarias_do_Beneficiamento_da_Castanha_de_Caju_Antes_e_Apos_Tratamento_em_Reator_Biologico_Experimental. Acesso em: 25 set. 2019.

PINEDO, M. et al. Molecular characterization of Helja, an extracellular jacalin-related protein from *Helianthus annuus*: Insights into the relationship of this protein with unconventionally secreted lectins. **Journal of plant physiology**, v. 183, p. 144-153, 2015. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26140981/>. Acesso em: 13 set. 2019.

PIRES, Ana Paula C. et al. Estudo sobre a sensibilidade dos caprinos à toxidez de crotalárias tóxicas para bovinos visando a sua utilização na profilaxia. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 501-512, 2015. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v35n6/1678-5150-pvb-35-06-00501.pdf>. Acesso em: 17 set. 2019.

POLONIO, I. B. et al. Tratamento com lodenafila no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. **J. bras. pneumol.**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 421-424, 2014. Disponível em:
https://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=2313. Acesso em: 17 set. 2019.

REGO, E. J. et al. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 441-446, 2002. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12052508/>. Acesso em: 04 set. 2019.

SALLES, H. O. et al. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 136-143, 2014. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/rbpv/v23n2/0103-846X-rbpv-23-02-136.pdf>. Acesso em: 04 set. 2019.

SANDINI, T. M. et al. *Senecio brasiliensis* e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 83-92, 2013. Disponível em:

<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2013v26n2p83/24697>. Acesso em: 03 set. 2019.

SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & LO Williams. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 3, p. 117-123, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24446375/>. Acesso em: 07 set. 2019.

SAVARIS, T. et al. Experimental poisoning by *Crotalaria lanceolata* and *Crotalaria pallida* seeds in broilers. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 39, n. 11, p. 863-869, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v39n11/1678-5150-pvb-39-11-863.pdf>. Acesso em: 24 set. 2019.

SILVA, C. M. et al. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1047-1053, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v29n5/31069.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SILVA, J. C. et al. Prospecção tecnológica de alcaloides usados no tratamento da dor. **Revista GEINTEC**, v. 5, n. 3, p. 2284-2295, 2015. Disponível em: <http://www.revistageintec.net/index.php/revista/article/view/477>. Acesso em: 26 set. 2019.

SILVA-LÓPEZ, R. E. S.; PACHECO, J. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**, v. 5, n. 3, p. 43-52, 2010. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/122/121>. Acesso em: 20 set. 2019.

STILLMARK, H. **Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus Communis L. und einigen anderem Euphoebiaceen**, Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

SUN, Q. et al. Two new pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria albida*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 449-452, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v39n11/1678-5150-pvb-39-11-863.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2019.

TANG, C. et al. Simultaneous extraction and separation of flavonoids and alkaloids from *Crotalaria sessiliflora* L. by microwave-assisted cloud-point extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 175, p. 266-273, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586616307110>. Acesso em: 26 ago. 2019.

TOEBE, M. et al. Sample size for estimating mean and coefficient of variation in species of crotalarias. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1705-1715, 2018. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/aabc/v90n2/0001-3765-aabc-201820170813.pdf>. Acesso em: 26 set. 2019.

UBIALI, D.G. et al. Intoxicação aguda com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae) em suínos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 313-318, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n4/a07v31n4.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2019.

VARÓ, I.; NAVARRO, J.C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 48, n. 6, p. 563-569, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12143930/>. Acesso em: 11 ago. 2019.

VOLLHARDT, K. P.C., SCHORE, N. E. **Química orgânica: estrutura e função**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2004.

Francisco Maick dos Santos Marques

Mestrando em Biotecnologia pelo Centro Universitário Inta - UNINTA

Maria Gleiciane de Queiroz Martins

Pós-doctor do Mestrado em Biotecnologia no Centro Universitário Inta - UNINTA

Antônio Mateus Gomes Pereira

Mestre em Biotecnologia pelo Centro Universitário Inta - UNINTA

Messias Vital de Oliveira

Doutorando em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará

João Batista Cajazeiras

Docente do Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário Inta - UNINTA
