

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Odone Felipe Pippi da Rosa

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE MIMOSINA EM PARTES
AÉREAS VEGETATIVAS DE *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* (LAM.) DE WIT**

Porto Alegre

2018

Odone Felipe Pippi da Rosa

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE MIMOSINA EM PARTES
AÉREAS VEGETATIVAS DE *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* (LAM.) DE WIT**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Área de habilitação: Bacharelado

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto
Co-Orientadora: Dra. Fernanda de Costa

Porto Alegre

2018

“As coisas são o que são, e o caminho do guerreiro é o coração”

(Michel Echenique Isasa)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto;

por me aceitar em seu grupo de pesquisa, mesmo sabendo minhas limitações de horário, e por confiar a mim seu laboratório em períodos fora de horário comercial. Agradeço a ele a oportunidade que me deu, sua incrível orientação e seu espírito amigo e empreendedor.

À Dra. Fernanda de Costa;

por ter me ajudado e me acompanhado ao longo de todo processo, por ter sido paciente e por ter me feito acreditar em momentos que cogitei desistir. Por ter sido mais que uma co-orientadora, uma amiga.

Aos meus pais;

pelo auxílio financeiro que me deram para que eu pudesse ir em horários fora do comum no laboratório, pela paciência que tiveram em ter um filho quase que completamente ausente ao longo do semestre inteiro, e pelo auxílio emocional, pois estiveram ao meu lado o tempo todo.

À minha namorada;

pelo auxílio na parte experimental, pela paciência de me ter ausente em muitos finais de semana e por todo amor que me dá.

A todo Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS;

pelo incrível acolhimento que me deram, por todas grandes e pequenas ajudas no dia a dia e pelo espírito amigo.

Odone Felipe Pippi da Rosa

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE MIMOSINA EM PARTES
AÉREAS VEGETATIVAS DE *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* (LAM.) DE WIT**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Kelly Cristine da Silva Rodrigues-Corrêa - UFRGS

Dra. Anna Carolina Alves Yendo- UFRGS

RESUMO

Mimosina é um aminoácido não proteico presente na forrageira *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, cujo nome popular é Leucena, dotado de diversas atividades de interesse farmacêutico, tais como anti-inflamatória, inibidora de ciclo celular, indutora de alopecia, alelopática, antimicrobiana, entre outras. Leucena é uma espécie de fácil cultivo e amplamente distribuída no mundo, possuidora de uma quantidade expressiva de proteína em sua matéria fresca, o que a torna útil para uso na alimentação animal. Contudo, o amplo uso da leucena é limitado por alguns fatores. Como forrageira, o acúmulo de mimosina pode apresentar toxicidade em alguns animais, precisando a planta ser fornecida em combinação com outras forragens ou com adição de adjuvantes para reduzir toxidez. Em função disto, o foco da maioria dos estudos em relação a este aminoácido visa sua redução. No entanto, sua exploração é relevante graças às diversas propriedades de valor farmacêutico e como herbicida natural. A síntese *in vitro* de mimosina é possível, mas apresenta viabilidade econômica limitada, tornando o produto caro e dificultando seu uso industrial. A mimosina comercializada por empresas de reagentes químicos de laboratório é extraída de sementes de leucena, processo já descrito na literatura. A extração a partir da parte aérea é uma alternativa potencialmente interessante por propiciar acesso ao material vegetal durante o ano inteiro. Neste estudo, foi conduzida a otimização deste processo considerando diversos parâmetros, como condições de manutenção pós-colheita, proporções de biomassa/extrator ácido, tempo de aquecimento, pulverização com N₂ líquido ou maceração mecânica. De modo geral, as melhores condições encontradas quanto ao rendimento de mimosina foram maceração mecânica, proporção de 1:10 (p/v) de extrator ácido, 10 minutos de aquecimento e pós-colheita em estufa, freezer ou ultrafreezer. A pulverização com nitrogênio líquido mostrou ser menos eficaz como alternativa para a extração de mimosina. Tanto o rendimento quanto a pureza obtida foram sempre maiores nas amostras maceradas relativamente às aquelas pulverizadas com N₂ líquido.

Palavras-chave: Mimosina, *Leucaena leucocephala*, Extração, Otimização.

ABSTRACT

Mimosine is a non-protein amino acid present in the forage tree *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. The metabolite shows a number of relevant bioactivities, such as anti-inflammatory, cell cycle blocker, alopecia inducer, allelopathic, antimicrobial, among others. *Leucaena* is rich in protein, being easily cultivated around the world, making it useful as an animal feed. However, the widespread use of *leucaena* is limited by some factors. As a forage crop, *leucaena* may present some toxicity to animals as a function of its mimosine accumulation, requiring it to be supplied along with other forage biomass or with addition of adjuvants to mitigate toxicity. As a result, the focus of most studies regarding the amino acid aim at reducing its concentration in the plant. However, because of its numerous properties of pharmaceutical value and as a natural bioherbicide, commercial exploration of mimosine is relevant. Chemical synthesis of mimosine is possible, but its economic viability is limited, making the product expensive and hindering its industrial use. Commercial mimosine sold by chemical reagent companies derives from *leucaena* seeds using a previously described process. Extraction from shoots is a potentially interesting alternative since it provides a year round source of biomass. In the present study, an optimization of mimosine extraction was carried out, considering several parameters, such as post-harvest storage conditions, ratio of biomass/acid extractor (w/v), time of heating application, pulverization in liquid nitrogen or mechanical maceration. Overall, best yields were obtained using mechanical maceration, a 1: 10 (w/v) ratio of biomass/acid extractor, 10 min of heating, and postharvest storage in oven, freezer or ultrafreezer. Pulverization in liquid nitrogen was a relatively less effective mimosine extraction alternative. Both mimosine quantity and purity of the chromatographic peak were always higher in mechanically macerated samples when compared to those of pulverized in liquid nitrogen.

Keywords: Mimosine, *Leucaena leucocephala*, Extraction, Optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diversidade de metabólitos secundários.....	2
Figura 2 – Metabólitos secundários e a humanidade.....	3
Figura 3 – Rotas de síntese e degradação da mimosina.....	5
Figura 4 – Número anual de publicações com palavra-chave mimosina (Pubmed).....	7
Figura 5 – Aspecto vegetativo de plantas adultas de leucena.....	8
Figura 6 – Aspecto de plântulas de leucena em sala de crescimento.....	12
Figura 7 – Delineamento experimental utilizado neste trabalho.....	13
Figura 8 – Metodologias de extração.....	15
Figura 9 – Comparativo de resultados.....	17
Figura 10 – Comparativo dos melhores resultados.....	18
Figura 11 – Comparativo de purezas.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	1
1.2 MIMOSINA	4
1.3 LEUCAENA LEUCOCEPHALA (Lam.) De Wit	6
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 OBJETIVO GERAL	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 ESCARIFICAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	11
4.2 TRATAMENTOS	11
4.3 EXTRAÇÃO	11
4.3.1 MACERAÇÃO MECÂNICA	13
4.3.2 PULVERIZAÇÃO	14
4.4 ANÁLISE EM HPLC	14
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	21
7. REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O termo metabólitos secundários (MbS) foi empregado pela primeira vez em 1891 por Kossel (Kossel, 1891) em referência a compostos que não eram essenciais para a vida vegetal, diferindo de metabólitos primários, que agrupavam compostos tão essenciais à vida vegetal que podiam ser encontrados em qualquer célula vegetal capaz de se dividir. Metabólitos secundários estão amplamente presentes no Reino Vegetal (Moore *et al.*, 2013) e apresentam funções diversas, como proteger contra patógenos e herbívoros, mediar interação entre polinizadores e fungos micorrízicos, atrair predadores de herbívoros, proteger contra fatores abióticos como seca e radiação solar, entre outras (Dixon & Paiva, 1995)

A surpreendente diversidade de funções dos MbS é devido à ampla variedade de composições químicas, às quais Pichersky, em 2000, se referiu:

“Plants produce an amazing diversity of low molecular weight compounds. Although the structures of close to 50 000 have already been elucidated, there are probably hundreds of thousands of such compounds. Only a few of these are part of ‘primary metabolic’ pathway (those common to all organisms). The rest are termed ‘secondary metabolites’ [...]”

Essa enorme variação química é resultado de agentes seletivos ao longo do curso da evolução (Wink, 2003). Visto que as plantas são seres sésseis e não possuem um sistema imune complexo como o dos animais, sua proteção é dependente de mecanismos químicos (Wink, 2013).

Metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química e incluem diversas classes e subclasses de compostos (**Figura 1**). Algumas dessas classes e subclasses são: alcaloides, terpenos, fenólicos, glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não proteicos.

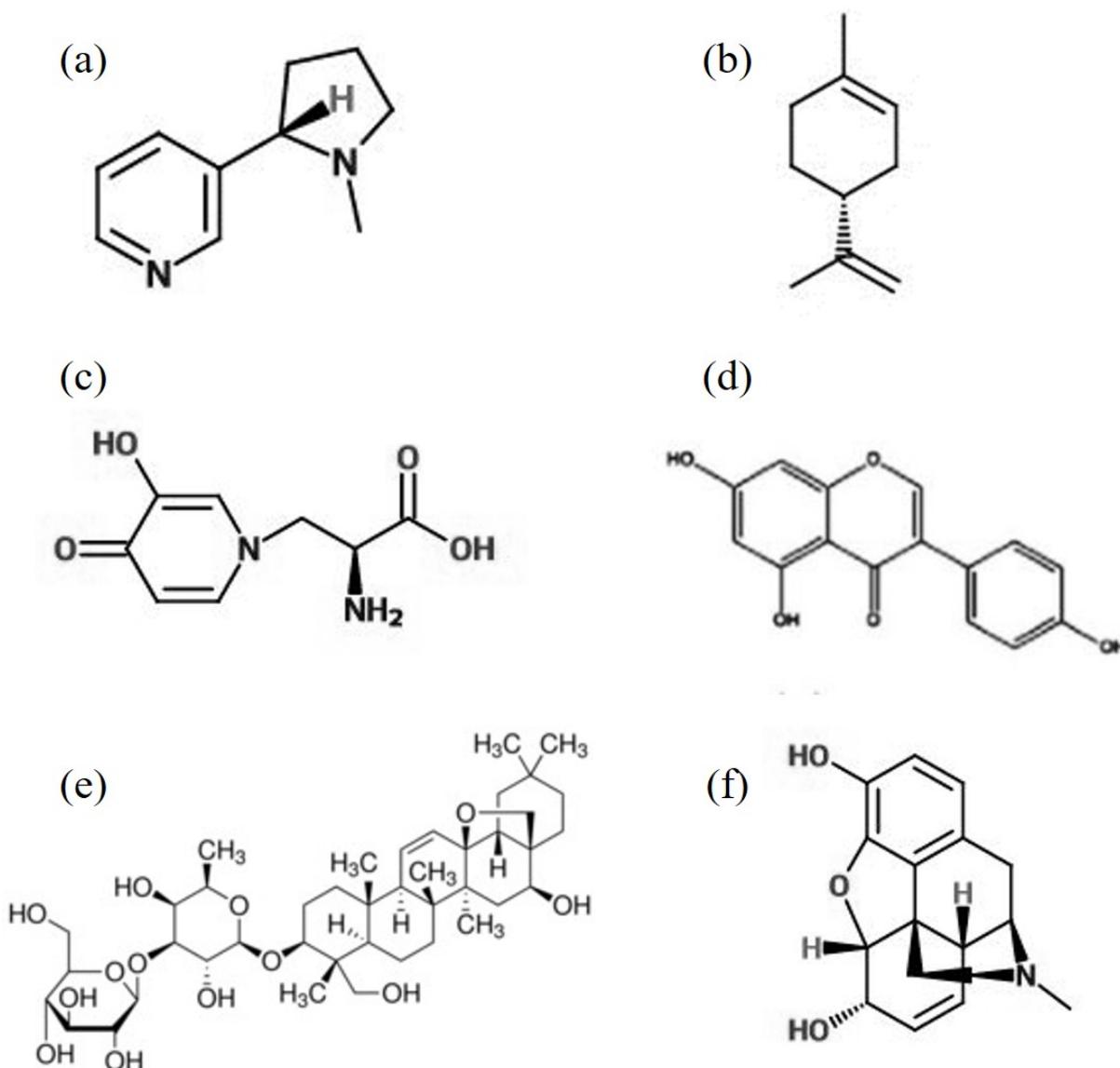


Figura 1: Diversidade de metabólitos secundários. **(a)** Nicotina, alcaloide encontrado em *Nicotiana tabacum*, **(b)** Limoneno, terpeno encontrado em *Citrus* spp., **(c)** Mimosina, aminoácido não proteico encontrado em *Leucaena* spp., **(d)** Genisteína, isoflavonoide encontrado em *Coffea* spp. **(e)** Saponina triterpênica, extraída de *Bupleurum falcatum* e **(f)** Morfina, opióide encontrado em *Papaver somniferum*.

Cedo na sua história, humanos já tinham contato com os metabólitos secundários, e alguns de seus usos estão descritos nos registros mais antigos (**Figura 2**). Evidências de 4000 anos antes de Cristo em placas de barro e escritas em caracteres cuneiformes mencionam cerca de 250 plantas com provável uso de seus compostos naturais (Wink, 1998), entre as

quais está *Papaver somniferum* (papoula), que contém morfina e codeína; *Atropa belladonna* (beladona) e *Mandragora officinarum* (mandrágora), que possuem alcaloides tropânicos psicoativos (Theis & Lerdau, 2003; Jackson & Berry, 1979).



Figura 2: Metabólitos secundários e a humanidade. Dioscorides, considerado o fundador da farmacognosia, recebendo uma mandrágora (*Mandragora officinarum*) da Deusa Euresis. A imagem é datada de 512 e está gravada colorida em um prato. (Wink, 1998).

Os metabólitos secundários são de grande interesse humano, e são extensamente estudados devido à relevância industrial e seu impacto no mercado (Bennet & Wallsgrove, 1994). É difícil precisar a importância econômica dos MbS e levantar dados completos com números absolutos, mas, na indústria farmacêutica, os alcaloides ainda ocupam papéis de destaque. A colchicina, por exemplo, serviu como modelo para o desenvolvimento de

análogos sintéticos (Schläger & Dräger, 2016). Na indústria alimentícia, alguns terpenos e alcaloides são amplamente utilizados como corantes (Socaciu, 2008) e a vanilina, um aldeído fenólico, é utilizado principalmente como flavorizante (Walton *et al.*, 2003).

1.2 MIMOSINA

Mimosina, ou ácido (β -[N-(3-hidroxi-4-oxipiridil)]- α -aminopropiônico ($C_8H_{10}N_2O_4$) é um metabólito secundário da classe dos aminoácidos não proteicos (Xuan *et al.*, 2013) e um dos principais compostos encontrados na subfamília das Mimosoideae. Foi descrito pela primeira vez na Alemanha nos laboratórios de Produtos Químicos da Bayer, em 1936, por Jany Renz (Renz, 1936), e sua estrutura química foi elucidada por Bickel, em 1947 (Bickel, 1947a; Bickel 1947b) (**Figura 3**).

Sua síntese em laboratório foi obtida, pela primeira vez, em 1949 através da condensação do ácido tosilamínico com 3-metoxi-4-pirona na presença de quantidade equimolar de hidróxido de sódio, resultando em 46 % de *O*-metil-*N*-tosilmimosina. Por fim, a hidrólise com ácido hidrobromico e hidrodioico sob determinadas condições resultam na formação de mimosina. No entanto, o rendimento da reação era baixo e a reprodutibilidade pouco consistente (Notation, 1963). Notation, no entanto, sugeriu uma rota alternativa com pequenas variações que aumentaram o rendimento de síntese de mimosina para mais de 70%. Pouco foi feito desde então acerca da síntese da mimosina sendo que a revisão mais recente sobre a mimosina, que também aborda sua síntese, é a de Nguyen e Tawata (2016), que afirma:

“To our knowledge, no novel procedure for the synthesis of mimosine has been developed until now. This is because the purification of mimosine from plants, now performed on a preparative scale, somewhat limits the motivation for the development of new methodologies for mimosine synthesis.”

Sua biossíntese se dá a partir da condensação entre *O*-Acetil-*L*-serina e 3,4-Dihidroxipiridina (3H-4-P) (Murakoshi *et al.*, 1972; Ikegami *et al.*, 1990) (**Figura 3**), reação catalisada pela enzima Mimosina sintase (Murakoshi *et al.*, 1984). A Mimosina sintase, no entanto, é tema de controvérsia uma vez que a expressão heteróloga do gene que a codifica não foi capaz de catalisar a reação esperada (Borthakur *et al.*, 2014). A degradação da mimosina foi reportada por Suda, em 1960, que encontrou *L*-serina como único catabólito. No entanto, outros autores encontraram 3,4-dihidroxipiridona e amônia como produtos da

degradação da mimosina em um experimento desenvolvido em ovinos (Hegarty *et al.*, 1964). Hoje em dia é consenso que a degradação da mimosina resulta nos compostos detectados por Hegarty *et al.*, acrescidos de piruvato (Paul, 2000) (**Figura 3**).

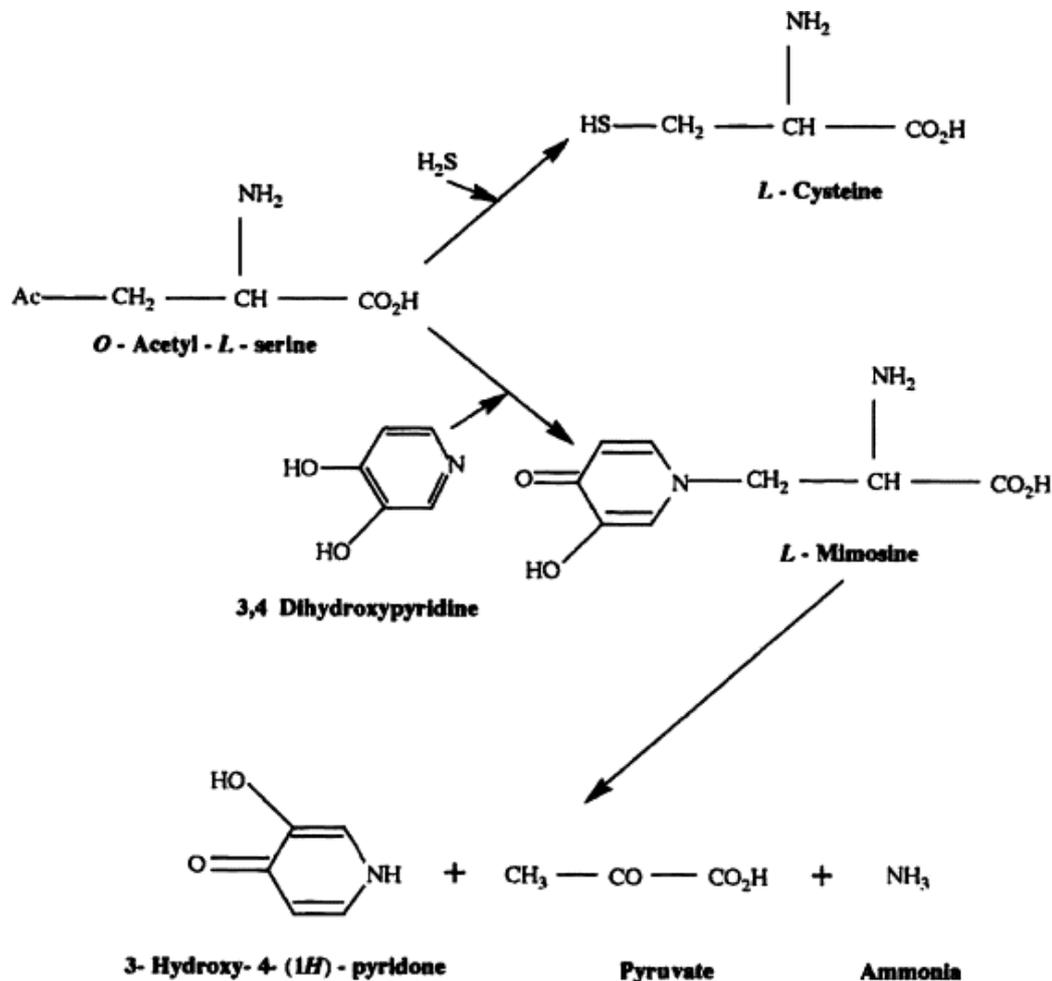


Figura 3: Rotas de síntese e degradação da mimosina (Vestena *et al.*, 2001).

A mimosina tem sido amplamente estudada (**Figura 4**) principalmente devido às características alelopáticas, que representam uma oportunidade de seu uso como um potente bioherbicida (Xuan *et al.*, 2006), e farmacológicas, como inibidora de ciclo celular (Wang *et al.*, 2000), como anti-inflamatório (Frydas *et al.*, 2004), entre várias outras (Joseph *et al.*, 2013). A capacidade de inibir o ciclo celular despertou muito a atenção dos estudos acerca da mimosina devido aos seus possíveis usos como agente antitumoral e como regulador para uso em cultura celular.

Os mecanismos de ação da mimosina sobre o ciclo celular envolvem diversos aspectos. Um dos principais mecanismos é a capacidade do aminoácido de quelar metais,

particularmente ferro e zinco, afetando várias proteínas que contêm os metais. A mimosina afeta a capacidade de ligação da proteína CTF4 à cromatina, essencial para replicação do DNA, por induzir inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDK), além de promover a estabilização da proteína HIF-1-alfa, que atua como reguladora de crescimento e morte celular quando em hipóxia, em função da depleção de ferro. Mimosina quela zinco, causando inibição de transcrição do gene codificador de serina hidroximetil transferase (SHMT), o que resulta em menor síntese de glicina, purina e, por conseguinte, DNA (Perry *et al.*, 2005). O aminoácido também é capaz de inibir redutase de ribonucleotídeos (RR), diminuindo a sua concentração e causando desequilíbrio de nucleotídeos trifosfatados (dNTPs), e assim aumentando quebras de DNA. A mimosina também regula fortemente o ponto de checagem de progressão do ciclo celular mediado pela proteína ATM (ataxia telangiectasia mutada), travando o ciclo na fase G1 para S (Nguyen & Tawata, 2016).

Considerando a sua capacidade de inibir crescimento por bloquear a divisão celular, é possível que a mimosina também atue como composto com ação alelopática. Por outro lado, pelo aminoácido ter alta capacidade em quelar ferro, zinco, níquel, cobre e outros metais pesados não essenciais (Nguyen & Tawata, 2016), pode ter papel na nutrição mineral de leucena, bem como na redução de toxidez do solo. Estas propriedades abrem perspectivas para sua aplicação em fitorremediação de ambientes contaminados com metais.

1.3 *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* (Lam.) De Wit

Leucaena leucocephala (Lam.) De Wit (Figura 5) é uma leguminosa arbóreo-arbustiva (**Figura 5A**) nativa do México e amplamente distribuída por regiões de alta pluviosidade das Américas, da Ásia e da África, principalmente entre 30°N e 30°S (Mello & Acamovic, 1988; Garcia *et al.*, 1996). Pertence à subfamília Mimosoideae (Drummond & Ribaski, 2010), atinge até 20 m de altura com 30 cm de diâmetro à altura do peito e apresenta folhas bipinadas de 15 a 20 cm de comprimento com número de folíolos variados. Suas flores são brancas (**Figura 5B**) e apresentam-se em capítulos globulares, suas vagens variam de 12 a 18 cm de comprimento (**Figura 5C**) e possuem de 15 a 30 sementes (**Figura 5D**). Seu nome popular varia de região para região, sendo conhecida, por exemplo, como Ipil-ipil nas Filipinas, Lamtoro na Indonésia, Koa Haole no Hawaíi, Leucena no Brasil e Subabul na Índia.

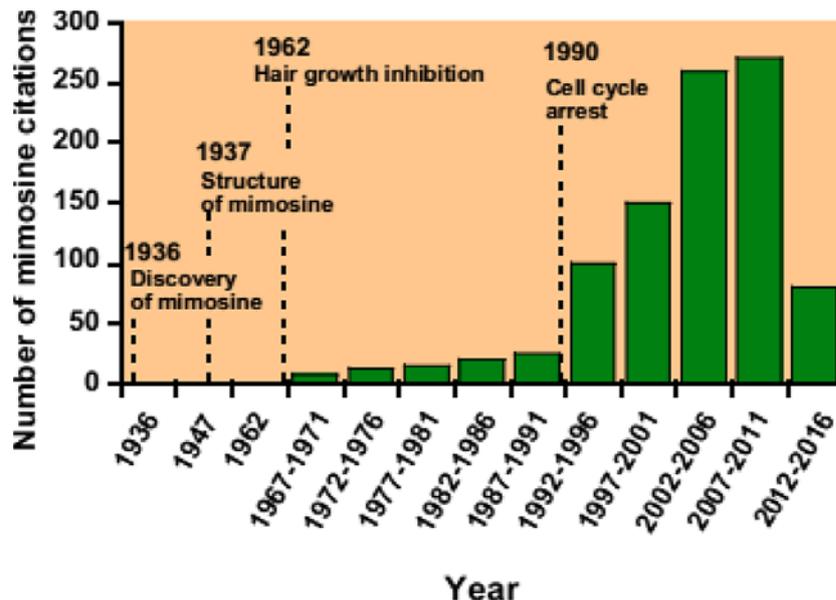


Figura 4: Número anual de publicações contendo a palavra-chave mimosina (Pubmed). As linhas vazadas representam publicações de grande impacto para o conhecimento a respeito da mimosina. ADAPTADO de Nguyen & Tawata, 2016.

Leucena tem sido amplamente estudada devido a seu potencial como forrageira, uma vez que é uma leguminosa rica em proteína, de fácil cultivo, e que pode ser uma alternativa para complemento alimentar de animais como cabras (Gidhar *et al.*, 1991; Harun *et al.*, 2017), tilápias (Wee & Wang, 1986), camarão (Vogt *et al.*, 1986), galinhas (Atawodi *et al.*, 2008), coelhos e porcos (Mtenga & Laswai, 1994), bovinos e ovinos (Kudo *et al.*, 1984; Gebrehiwot *et al.*, 2017), entre outros. Além dos estudos citados anteriormente, a leucena tem recentemente sido avaliada como fonte de biocombustível (Hakimi *et al.*, 2017; Loaiza *et al.*, 2017).

Apesar de ser uma espécie extremamente proteica, leucena apresenta altos níveis de mimosina, cuja concentração varia de maneira órgão-específica (Adeneye, 1990), sendo que as folhas cotiledonares apresentam uma maior concentração (Vestena *et al.*, 2001), seguidas pelas folhas jovens. Em conjunto com seu principal catabólito, 3H-4-P, mimosina em excesso é tóxica para animais (Dalzell *et al.*, 2012). Diversos efeitos colaterais foram reportados acerca do consumo de *L. leucocephala* por ruminantes (Jones & Megarrity, 1986; Hegarty *et al.*, 1964; Jones *et al.*, 1976; Dalzell *et al.*, 2012), que incluem sintomas como alopecia, salivação excessiva, aumento da glândula tireoide, lesões no esôfago, perda de apetite, perda de peso e eventualmente morte. Esses fatores dificultam a implantação de leucena como suplemento alimentar animal de modo generalizado, mesmo sendo altamente proteica. Este

fato acaba conduzindo grande parte das pesquisas para seleção e otimização de processos de redução da quantidade de mimosina nos indivíduos.

O presente projeto visa, ao contrário do direcionamento atual da maioria das pesquisas acerca de mimosina em leucena, facilitar a obtenção do referido aminoácido através da otimização do processo de extração usando partes aéreas de *L. leucocephala* a fim de oferecer diretrizes para reduzir seu preço de mercado e, portanto, facilitar sua aplicação industrial.

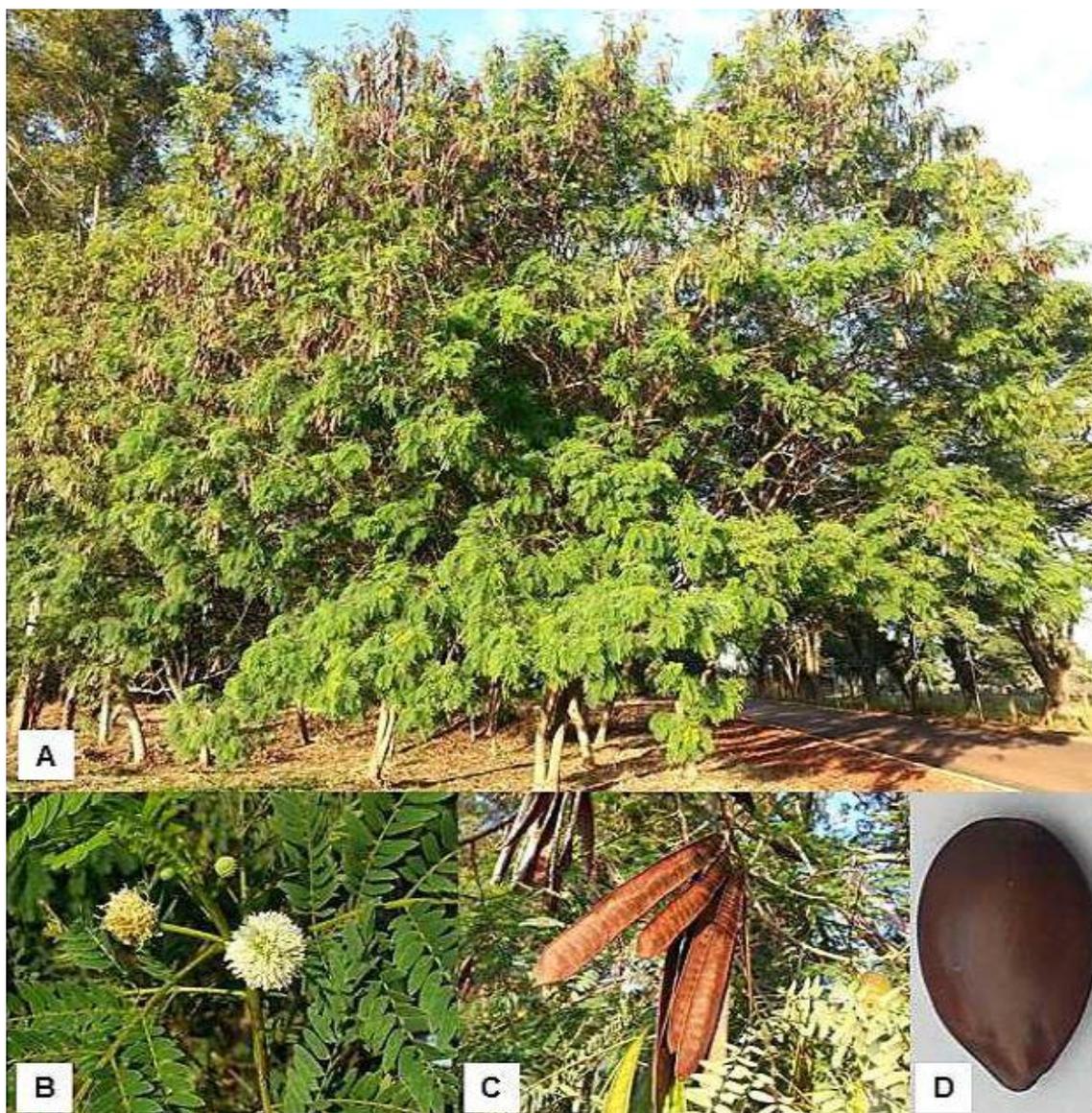


Figura 5: Aspecto de plantas adultas de leucena. (A) Aspecto Geral; (B) Flores dispostas em capítulo globular; (C) Vagem de Leucena; (D) Semente de Leucena. (Dipe, 2013). O comprimento das folhas varia de 15 a 20 cm e o comprimento das vagens varia de 12 a 18 cm com 15 a 30 sementes.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando as diversas funções bioativas da mimosina e a baixa viabilidade econômica de sua síntese *in vitro*, o presente trabalho visa testar diferentes maneiras de extração de mimosina das partes aéreas de *L. leucocephala* buscando aquela com o maior rendimento e a maior pureza do aminoácido a fim de otimizar o processo de obtenção e tornar o composto mais aplicável na indústria. A maior parte das publicações presentes na literatura tem por finalidade a redução e remoção da mimosina de leucena para torná-la menos nociva para os animais quando utilizada como forrageira. O presente trabalho, no entanto, almeja contribuir com informações para o aumento da produção de mimosina com fins farmacológicos e agroindustriais.

A mimosina comercial atualmente advém de sementes de leucena, e um grama da mesma custa cerca de R\$ 2.300,00 conforme catálogo da Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m0253>, acesso em 09/01/18). Existem diferentes protocolos disponíveis na literatura para a extração em sementes (Spencer & Notation, 1962; Harith *et al.*, 1986), no entanto há poucos estudos sistemáticos sobre a extração de folhas e outras partes aéreas (Adeneye, 1990) que representam uma fonte mais constantemente disponível ao longo do ano.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho visa otimizar o processo de extração de mimosina em *L. leucocephala* para melhor disponibilizar esse composto a indústrias de interesse, como, por exemplo, farmacêutica e de bioherbicida. A viabilidade de aplicação desse composto poderia trazer soluções para diversas áreas da indústria a um preço reduzido, uma vez que mimosina está presente na parte aérea vegetativa de indivíduos de leucena, podendo ser extraída de forma relativamente simples.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes métodos de extração e diversos parâmetros para a obtenção de mimosina com maior rendimento e pureza de mimosina, visando o fornecimento estável e a custo viável deste aminoácido para uso econômico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qual condição de pós-colheita resulta em menor degradação da mimosina em partes aéreas de plântulas de *L. leucocephala*.
- Comparar duas metodologias diferentes de extração (maceração mecânica e pulverização).
- Examinar diferentes proporções (1:10 e 1:20) de solvente extrativo (HCl 0,1N) e água durante o processo de extração.
- Testar diferentes tempos (5, 10 e 20 minutos) de extração sobre uma chapa aquecida a 100 °C.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESCARIFICAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As sementes foram escarificadas por imersão em ácido sulfúrico P.A. (98%) durante 25 minutos, conforme protocolo previamente descrito (Aquila & Fett-Neto, 1988). A seguir, foram lavadas 10 vezes em água destilada para completa remoção do H₂SO₄. Os diásporos foram dispostos em tubetes com capacidade de 50 mL preenchidos com substrato Humosolo[®] e Vermiculita previamente autoclavados por 50 minutos a 121 °C e misturados em proporção 1:1. A taxa média de germinação foi de 85,2 %. As plantas receberam água diariamente durante o período de seis semanas e seu desenvolvimento foi acompanhado semanalmente (**Figura 6**). Após esse período, plantas foram colhidas conforme descrito no item 4.2. A temperatura da sala de cultivo se manteve entre 23 ± 2 °C e o fotoperíodo foi de 16 horas de luz e 08 horas de escuro (iniciando a iluminação às 07 h e finalizando às 23 h), sendo a irradiância média de 83 μM fótons.m⁻². s⁻¹.

4.2 TRATAMENTOS

Após o período de cultivo de seis semanas as plantas foram utilizadas para os tratamentos de extração. Somente a parte aérea foi utilizada para a extração, e a parte radicular foi retirada na altura do coleto e descartada. Uma amostra era composta pelas partes aéreas de duas plantas, e cada amostra foi pesada e distribuída de acordo com um dos quatro tratamentos de pós-colheita: (a) Ultrafreezer (-80 °C), (b) Freezer (-20 °C), (c) Geladeira (+4 °C) e (d) Estufa (60 °C) a fim de identificar qual a forma de armazenamento da matéria vegetal pós-colheita propicia maior rendimento de mimosina. Foram utilizadas 48 amostras para cada tratamento, sendo que o período de armazenamento durou 10 dias e, após esse período, todos os tratamentos foram alocados em um ultrafreezer, condição em que foi assumido que não haveria degradação da mimosina, até o momento de sua extração.

4.3 EXTRAÇÃO

As 48 amostras contidas em cada tratamento foram separadas em duas formas diferentes de extração, sendo que 24 amostras foram maceradas de forma mecânica e as outras

24 foram pulverizadas utilizando nitrogênio líquido. As amostras de cada forma de extração ainda foram divididas em subgrupos com base na proporção de adição de extrator por matéria fresca (1:10 ou 1:20 p/v) e no tempo de permanência em uma chapa de aquecimento a 100 °C (**Figura 7**). As metodologias de maceração foram escolhidas baseadas em ensaios preliminares.



Figura 6: Aspecto de plântulas de leucena em sala de crescimento. Cada foto representa a respectiva semana após o semeio, sendo, por exemplo, a primeira (canto superior esquerdo) uma semana após o semeio, e assim por diante. As plantas foram colhidas na sexta semana.

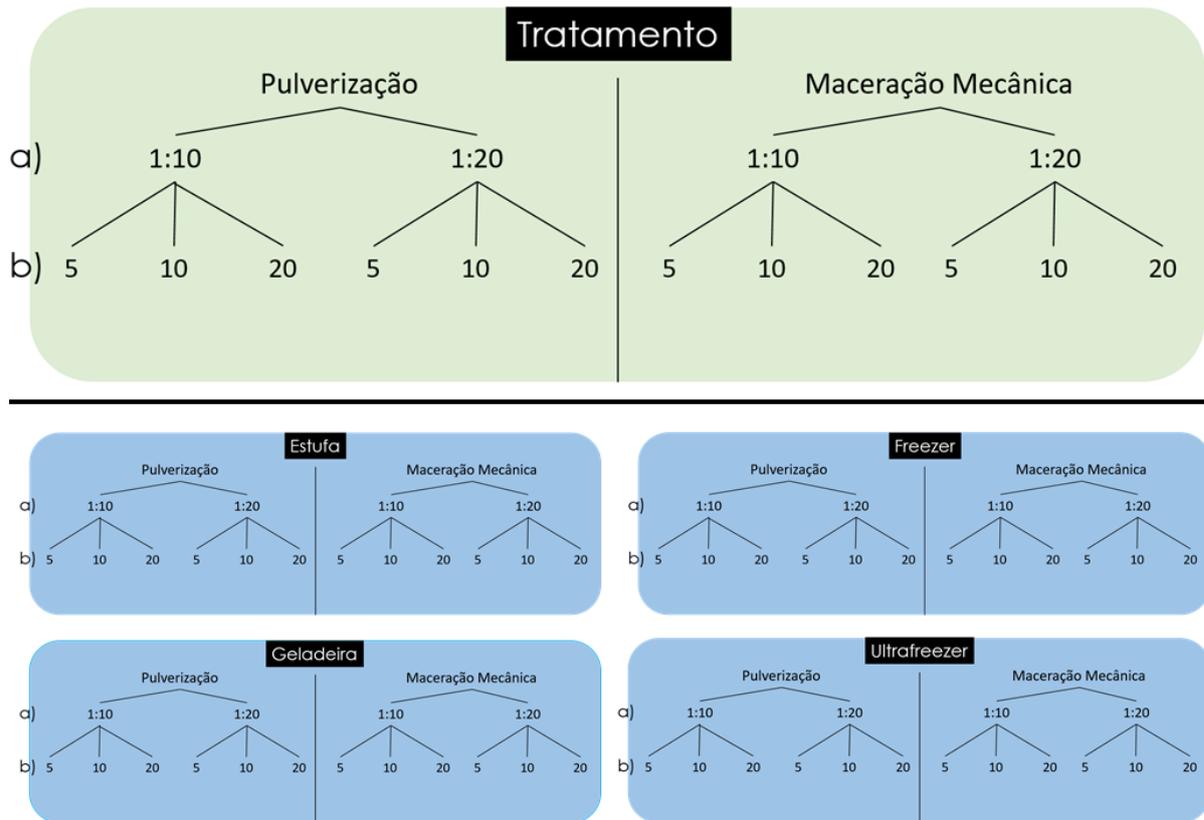


Figura 7: Delineamento experimental utilizado neste trabalho. Na imagem superior têm-se um esquema geral dos métodos de extração: pulverização, com nitrogênio líquido e maceração mecânica. A letra **a)** refere-se às duas proporções de adição de água ou ácido por matéria fresca (mL/g) que foram utilizadas durante o protocolo de extração. A letra **b)** refere-se ao tempo, em minutos, de aquecimento de mimosina sobre uma chapa de aquecimento a 100 °C. Na imagem inferior têm-se os tratamentos reais utilizados neste trabalho, divididos por formas de pós-colheita, sendo eles Freezer (-20 °C), Estufa (60 °C), Ultrafreezer (-80 °C) e Geladeira (4 °C).

4.3.1 MACERAÇÃO MECÂNICA

Nos tratamentos de maceração mecânica foi adicionada água Milli-Q em ebulição em proporção de 1:10 ou 1:20 em uma relação água por massa fresca de folhas de Leucena (mL/g) e depois dispostos sobre uma chapa de aquecimento a 100 °C durante 5, 10 ou 20 minutos. Após esfriamento da água, foi adicionado HCl 0,1N às amostras em volume igual ao de água (Borthakur & Soedarjo, 1996). Por fim, as amostras foram maceradas por 2 minutos pelo mesmo operador em todos tratamentos (Lalitha & Kulothungan, 2006) (**Figura 8**,

esquerda). As amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos a 4 °C, o pellet resultante foi transferido para um frasco de vidro, previamente pesado, para posterior análise de massa seca e 1mL do sobrenadante foi recentrifugado a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e armazenado no escuro a -20 °C para posterior análise em cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).

4.3.2 PULVERIZAÇÃO

Partes aéreas de leucena foram pulverizadas na presença contínua de nitrogênio líquido. Ao pó resultante foi adicionada água Milli-Q em ebulição em proporções de 1:10 ou 1:20 (m/V) em béqueres mantidos sobre uma chapa de aquecimento a 100 °C por 5, 10 ou 20 minutos. Após esfriamento da água, foi adicionado HCl 0,1N às amostras em volume igual ao de água, e as amostras foram sonicadas por 2 minutos (**Figura 8, direita**).

As amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado resultante foi transferido para um frasco de vidro, previamente pesado, para posterior análise de massa seca, e 1 mL do sobrenadante foi recentrifugado a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml e armazenado no escuro a -20 °C para posterior análise em HPLC.

4.4 ANÁLISE EM HPLC

As amostras foram diluídas 25 vezes com HCl 0.1N e analisadas em um sistema de HPLC Thermo Scientific Suveyor[®] equipado com uma coluna de fase reversa Shim-pack CLC-C8 (M) Shimadzu[®] de dimensões 150 x 4.6 mm e com uma coluna de guarda. A fase móvel consistiu em um sistema isocrático de ácido orto-fosfórico (2%) previamente filtrado através de uma membrana Millipore[®] de 0.45 µm. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL.min⁻¹ e a detecção foi feita em 254 nm com um detector UV (Negi & Borthakur, 2016; com pequenas modificações).

A identificação do conteúdo de mimosina nas amostras foi baseada no tempo de retenção, co-cromatografia com padrão e análise do espectro de absorção e pureza do pico cromatográfico correspondente ao analito de interesse com Detector de Diodos em Série. O padrão de mimosina foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, EUA). O conteúdo de mimosina foi expresso em µg/g de peso fresco extraído. Os dados também foram avaliados

por peso seco extraído. Como houve plena coerência dos valores entre tratamentos usando as duas formas de expressão de resultados, o peso fresco foi escolhido por razões de praticidade.

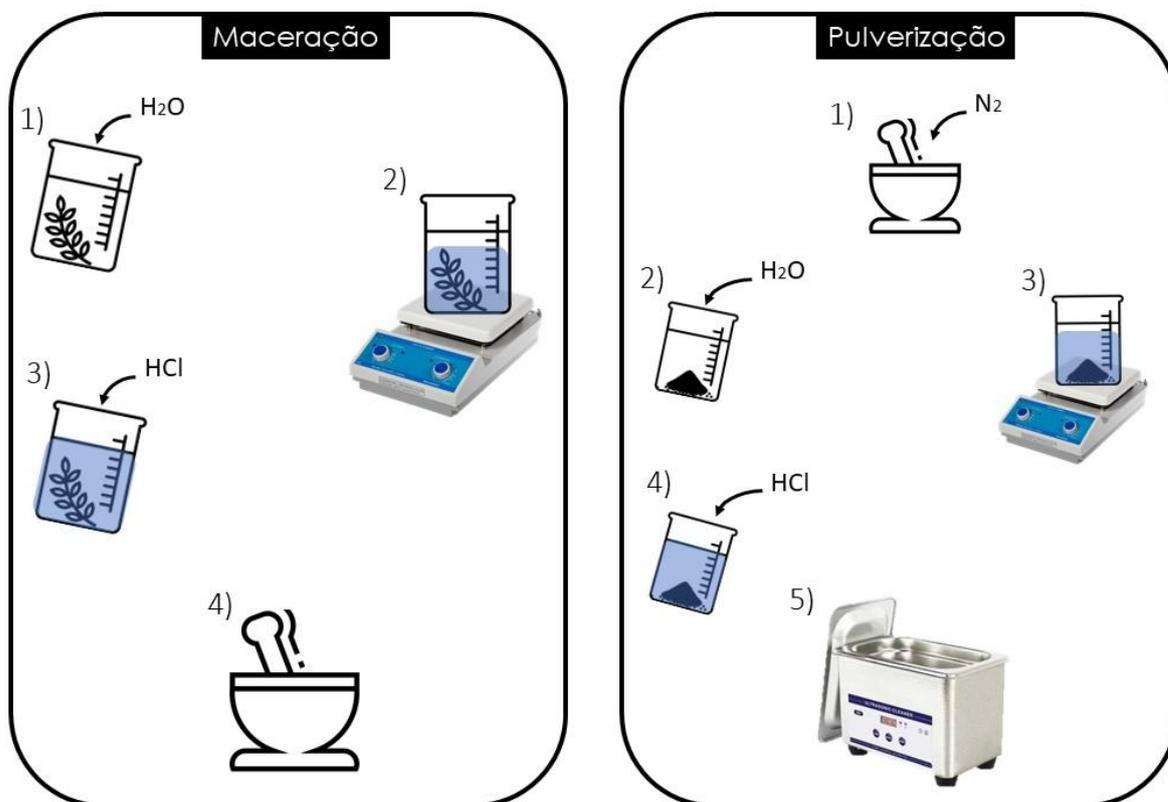


Figura 8: Comparativo entre as diferentes metodologias de extração utilizadas no presente trabalho. A maceração mecânica, ou apenas maceração (à esquerda) consistiu em: 1) Adição de água Milli-Q em ebulição em proporções de 1:10 ou 1:20, dependendo do tratamento. 2) Aquecimento em placa aquecida a 100 °C durante 5, 10 ou 20 minutos, dependendo do tratamento. 3) Adição de HCl 0,1 N em proporções de 1:10 ou 1:20 (p/v), ou seja, mesmo volume que foi adicionado de água na etapa 1 por amostra. 4) Maceração mecânica por 2 minutos. A pulverização (à direita) consistiu em: 1) Pulverização das amostras com nitrogênio líquido. 2) Adição de água Milli-Q em ebulição nas proporções de 1:10 ou 1:20, dependendo do tratamento. 3) Aquecimento em uma placa aquecida a 100 °C por 5, 10 ou 20 minutos, dependendo do tratamento. 4) Adição de HCl 0,1 N em proporções de 1:10 ou 1:20 (p/v), ou seja, mesmo volume que foi adicionado de água na etapa 2 por amostra. 5) Sonicação por 2 minutos. Após a etapa 4 da maceração, e 5 da pulverização, as amostras foram centrifugadas e tiveram seus precipitados transferidos para outro microtubo que foi armazenado conforme especificado no texto.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e analisados por ANOVA, seguida de teste de Tukey ou teste t-Student, conforme apropriado. Para todos os casos, usou-se um $P \leq 0.05$). As análises usaram o pacote estatístico GraphPad Prism 7. As análises aqui descritas foram realizadas seguindo um *layout* completamente aleatório e utilizando quadruplicatas biológicas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos tratamentos de pós colheita, com exceção da geladeira, foi observado um maior rendimento de mimosina com maceração mecânica, proporção de 1:10 e 10 minutos de extração em chapa de aquecimento. Para as amostras que foram alocadas na geladeira após sua colheita, o maior rendimento foi também com 10 minutos de extração e maceração mecânica, porém com uma proporção de 1:20 (**Figura 9**).

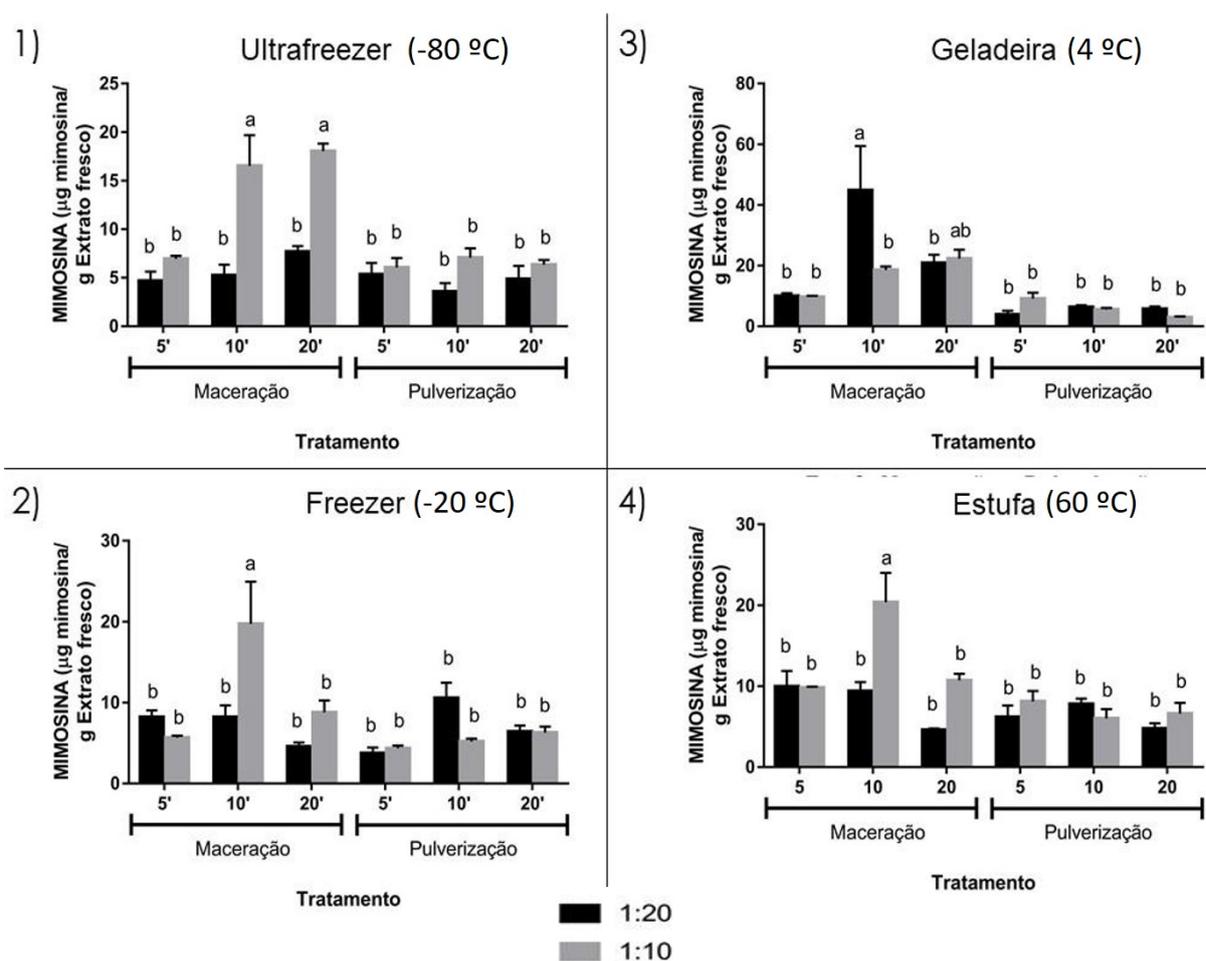


Figura 9: Comparação de método de extração dentro de cada tratamento de pós-colheita, expressos em µg de mimosina por g de extrato fresco. Os números 1, 2, 3 e 4 se referem aos tratamentos Ultrafreezer, Freezer, Geladeira e Estufa, respectivamente. Cada barra representa a média ± erro padrão de um conjunto de quatro amostras. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. Barras compartilhando letras não diferem entre si pelo teste utilizado ($P < 0,05$). Linhas no topo das barras indicam o erro padrão.

Estudos anteriores relataram que o armazenamento em estufa acima de 70 °C na presença de umidade reduziu o conteúdo de mimosina em folhas, o que não ocorreu em estufa livre de umidade (Matsumoto *et al.*, 1951). Em concordância com estas observações, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os melhores grupos de cada tratamento (**Figura 10**), indicando que, nas condições testadas, que incluíram estufa a seco a 60 °C, o modo de pós-colheita não resultou em perda de mimosina por degradação. Já a secagem ao sol por dois dias resultou em redução do teor de mimosina nas folhas, possivelmente por propiciar condições de calor com umidade remanescente no tecido por um período maior após a colheita (Wee, & Wang, 1987). É possível que a permanência do calor úmido por um tempo maior permita a ação de mimosinase ou enzimas de degradação não específicas (*e.g.* esterases e peroxidases).

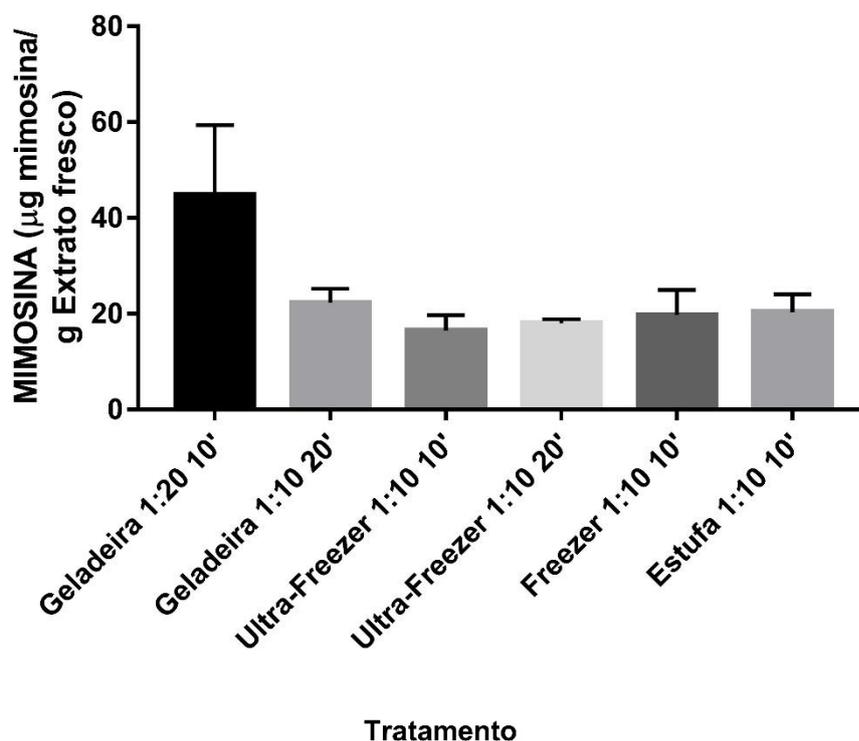


Figura 10: Comparação entre os tratamentos com maior rendimento de mimosina, expressa em µg por g de extrato fresco. Os valores observados não foram significativamente diferentes entre si. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. O erro padrão está expresso no topo das barras.

Nokihara e colaboradores (2012) descreveram uma metodologia para extração de mimosina em parte aérea de *L. leucocephala*, através de maceração estática e uso de resina de troca de cátions, obtendo um rendimento de 5 mg de mimosina por grama de matéria fresca. Este resultado foi superior ao encontrado neste trabalho (0,02 mg de mimosina por g de matéria fresca). No entanto, muitos fatores sobre a origem da biomassa devem ser levados em conta para que essa relação seja adequadamente comparada, como idade da planta, local e data de coleta, ação de fatores de estresse, etc., os quais foram diferentes nos dois estudos.

A fim de se conhecer qual das metodologias oferecia uma maior pureza da mimosina, foi analisada também a consistência espectrofotométrica dos picos de mimosina dos tratamentos que resultaram em maior rendimento do aminoácido (checagem de pureza de pico cromatográfico do software ChromquestTM do aparelho de HPLC) (**Figura 11**). Todos os tratamentos apresentaram uma diferença significativa na sua pureza em relação à forma de extração, pulverização ou maceração, sendo que a pureza da maceração foi sempre acima de 90%. Estudos anteriores descreveram uma metodologia de extração de mimosina de sementes de *L. leucocephala* sem maceração (Harith *et al.*, 1987), em que se obtinha uma pureza superior a 90 %, consistente com o que foi encontrado no presente trabalho.

Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que desenvolvesse alguma técnica de extração em leucena utilizando nitrogênio líquido para a pulverização, sendo que este trabalho foi, possivelmente, o primeiro. A quantidade de mimosina obtida pela pulverização (**Figura 9**), bem como sua respectiva pureza (**Figura 11**), foram significativamente inferiores em relação às amostras que passaram pelas mesmas condições de pós-colheita, de proporção ácido-água e de tempo sobre uma chapa de aquecimento, porém com maceração mecânica. Isso indica que, apesar da pulverização ser ergonomicamente mais fácil e menos trabalhosa, ela não é a melhor opção em termos de rendimento e possivelmente não é aplicável industrialmente.

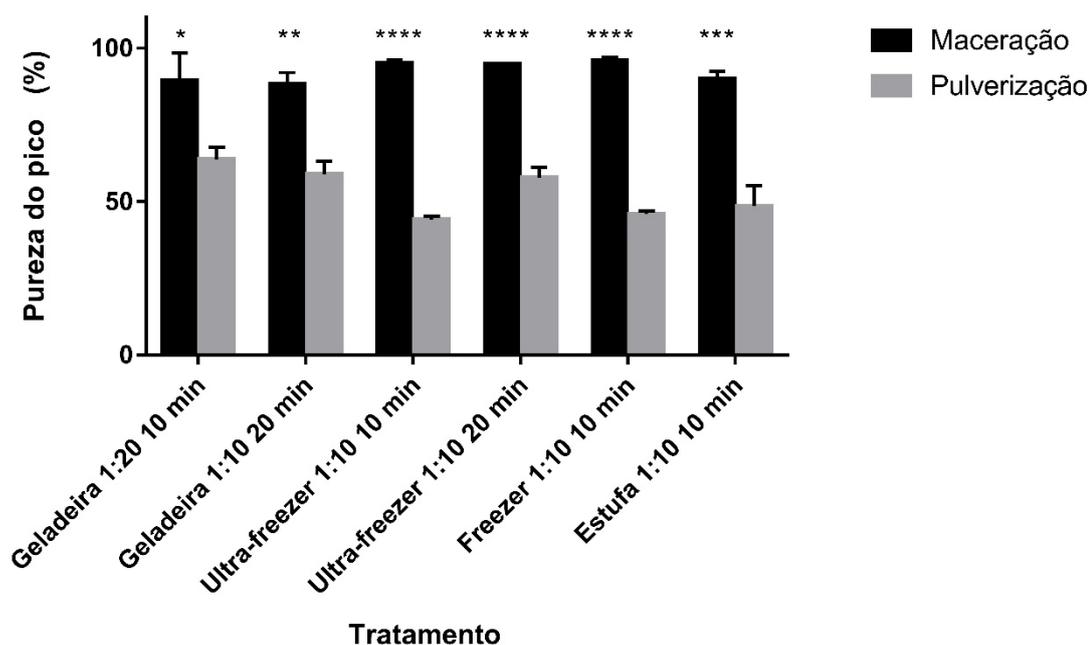


Figura 11: Comparativo de purzas dos picos de mimosina dentro de cada um dos tratamentos que apresentaram o maior rendimento do aminoácido e suas respectivas formas de extração: pulverização e maceração. Os valores, obtidos através de uma análise de pureza de três pontos do espectro de absorção por pico de mimosina, foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *t de Student*. Houve diferença significativa de pureza entre todos tratamentos, sendo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. O erro padrão está expreso acima das barras.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Por ser um composto extremamente promissor, dotado de diversas bioatividades economicamente relevantes, a mimosina possui potencial aplicação em diversas áreas, como, por exemplo, a indústria farmacêutica e a indústria de bioherbicidas. Apesar de possuir diversas funções, muitas das quais extremamente interessantes, seu uso é relativamente limitado por conta da baixa viabilidade de sua síntese química, o que dificulta a obtenção em larga escala desse composto e, portanto, sua aplicação.

O presente trabalho avaliou diversos parâmetros que podem ter implicações para a extração de mimosina em larga escala de plantas de *L. leucocephala*, espécie que produz esse metabólito secundário em quantidades expressivas e é amplamente distribuída no mundo. Apesar da fonte primária atual de mimosina serem as sementes, fica evidente que a parte aérea vegetativa representa uma fonte viável e amplamente disponível. Os parâmetros que possibilitaram maior rendimento foram, principalmente, aqueles em que se usa proporção de 1:10 (m/v) de água e ácido na maceração mecânica e um tempo de 10 minutos em placa aquecida a 100 °C, podendo o armazenamento pós-colheita ser em freezer (-20 °C), estufa (60 °C) ou ultrafreezer (-80 °C). Para a pós-colheita em geladeira (4 °C), os melhores parâmetros foram a proporção de 1:20 (m/v) e o tempo de 10 minutos. A pureza obtida, acima de 90%, indica a potencial aplicabilidade dos métodos aqui testados, com implicações para o desenho de metodologias de extração em escala industrial. O avanço nesta direção poderá oportunizar maior usufruto dos amplos benefícios econômicos deste produto natural extremamente versátil.

7 REFERÊNCIAS

- Adams, R., Johnson, J.L. Leucenol. VI. A total synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 71 (1949): 705-708.
- Adeneye, J.A. Mimosine content in various fractions of *Leucaena leucocephala* grown in western Nigeria. *Animal Feed Science and Technology* 33 (1990): 349-353.
- Aquila, M.E.A., Fett-Neto, A.G. Influência de processos de escarificação na germinação e crescimento inicial de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. *Revista Brasileira de Sementes* 10 (1988): 73-85.
- Atawodi, S.E., Mari, D., Atawodi, J.C., Yahaya, Y. Assesment of *Leucaena leucocephala* leaves as feed supplement in laying hens. *African Journal of Biotechnology* 7 (2008): 317-321.
- Bennet, R. N., Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127 (1994): 617-633.
- Bickel, A.F. On the Structure of leucaenine (leucaenol) from *Leucaena glauca* Betham. I. *Journal of the American Chemical Society* 69 (1947a): 1801-1803.
- Bickel, A.F. On the Structure of leucaenine (leucaenol) from *Leucaena glauca* Betham. II. *Journal of the American Chemical Society* 69 (1947b): 1805-1806.
- Borthakur, D., Soedarjo, M. Simple procedures to remove mimosine from young leaves, pods and seeds of *Leucaena leucocephala* used as food. *International Journal of Food Science and Technology* 31 (1996): 97-103.
- Borthakur, D., Yafuso, J. T., Negi, V.S., Bingam, J. An O-Acetylserine (thiol) lyase from *Leucaena leucocephala* is a Cysteine Synthase but not a Mimosine Synthase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 173 (2014): 1157-1168.
- Dalzell, S.A., Burnett, D.J., Doswet, J.E., Forbes, V.E., Shelton, H.M. Prevalence of mimosine and DHP toxicity in cattle grazing *Leucaena leucocephala* pastures in Queensland, Australia. *Animal Production Sciences* 52 (2012): 365-372.

Dipe, V.V. Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos da mimosina em ratos *Wistar*: estudos de imunotoxicidade, desregulação endócrina e comportamento sexual. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Dixon, R.A., Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7 (1995): 1085-1097.

Drummond, M.A., Ribaski, J. *Leucaena leucocephala*: leguminosa de uso múltiplo para semiárido brasileiro. Comunicado Técnico 262 Embrapa Florestas, 2010.

Frydas, S., Papaioannou, N., Papazahariadou, M., Hatzistilianou, M., Karagouni, E., Trakatelli, M., Brellou, G., Petrarca, C., Castellani, M.L, Conti, P., Riccioni, G., Patrino, A., Grilli, A. Inhibition of MCP-1 and MIP-2 chemokines in murine trichinellosis: effect of the anti-inflammatory compound L-mimosine. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 18 (2004): 85-93.

Garcia, G.W., Ferguson, T.U., Neckles, F.A., Archibald, K.A.E. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science* 60 (1996): 29-41.

Gebrehiwot, G., Negesse, T., Abebe, A. Effect of feeding *Leucaena leucocephala* leaves and pods on feed intake, digestibility, body weight changes and carcass characteristic of central-highland sheep fed basal diet wheat bran and natural pastura hay in Tigray, Ethiopia. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* 10 (2017): 367-376.

Gidhar, N., Lall, D., Pathak, N.N. Effect of feeding *Leucaena leucocephala* as the sole ration on nutrient utilization and body weight in goats. *Journal of Agricultural Sciences* 116 (1991): 303-307.

Hakimi, M.I., Khalilullah, Goembira, F., Ilham, Z. Engine-compatible biodiesel from *Leucaena leucocephala* seed oil. *Journal of the Society of Automotive Engineers Malaysia* (2017): 86-93.

Harith, E.A, Szyszka, M., Günther, K.D., Meulen, U. A method for large scale extraction of mimosine. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 57 (1987): 105-110.

Harun, N.L.A., Alimon, A.R., Jahromi, M.F., Samsudin, A.A. Effects of feeding goats with *Leucaena leucocephala* and *Manihot esculenta* leaves supplemented diets on rumen

- fermentation profiles, urinary purine derivatives and rumen microbial population. *Journal of Applied Animal Research* 45 (2017): 409-416.
- Hegarty, M.P., Schinckel, P.G., Court, R.D. Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth. and to its toxic principle mimosine. *Australian Journal of Agricultural Research* 15 (1964): 153-167.
- Ikegami, F., Mizuno, M., Kihara, M., Murakoshi, I. Enzymatic synthesis of the thyrotoxic amino acid mimosine by cysteine synthase. *Phytochemistry* 29 (1990): 3461-3465.
- Jacson, B., Berry, M. Mandragora, taxonomy and chemistry in European species in: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. London Academic Press (1979): 493-504.
- Jones, R.J., Blunt, C.G., Holmes, J.H.G. Enlarged thyroid glands in cattle grazing *Leucaena* pastures. *Tropical Grasslands* 10 (1976): 113-116.
- Jones, R.J., Megarrity, R.G. Successful transfer of DHP-Degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome toxicity in *Leucaena*. *Australian Veterinary Journal* 63 (1986): 259-262.
- Joseph, B., George, J., Mohan, J. Pharmacology and Traditional Uses of *Mimosa pudica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 5 (2013): 41-44.
- Kossel, H. Über die chemische zammensetzung der zellie. *Archiv fur Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin* (1891): 181-186.
- Kudo, H., Cheng, K.J., Majak, W., Hall, J.W., Costerton, J.W. Degradation of mimosine in rumen fluid from cattle and sheep in Canada. *Canadian Journal of Animal Science* 64 (1984): 937-942.
- Lalitha, K., Kulothungan, S.R. Selective determination of mimosine and its dihydroxypyridinyl derivative in plant systems. *Amino Acids* 31 (2006): 279-287.
- Loaiza, J.M., López, F., García, M.T., Díaz, M.J. Biomass valorization by using a sequence of acid hydrolysis and pyrolysis processes. Application to *Leucaena leucocephala*. *Fuel* 203 (2017): 393-402.

- Matsumoto, H., Smith, E.G., Sherman, G.D. The effect of elevated temperatures on the mimosine content and toxicity of Koa Haole (*Leucaena glauca*). Archives of Biochemistry and Biophysics 33 (1951): 201-211.
- Mello, J.P.F.D., Acamovic, T. *Leucaena leucocephala* in poultry nutrition – A Review. Animal Feed Science and Technology 26 (1988): 1-28.
- Moore, B.D., Andrew, R.L., Külheim, C., Foley, W. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytologist 201 (2014): 733-750.
- Mtenga, L.A., Laswai, G.D. *Leucaena leucocephala* as feed for rabbits and pigs: detailed chemical composition and effect of level of inclusion on performance. Forest Ecology and Management 64 (1994): 249-257.
- Murakoshi, I., Ikegami, F., Hinuma, Y., Hanma, Y. Purification and characterization of L-Mimosine Synthase from *Leucaena leucocephala*. Phytochemistry 23 (1984): 1905-1908.
- Murakoshi, I., Kuramoto, H., Haginiwa, J. The enzymic synthesis of β -Substituted alanines. Phytochemistry 11 (1972): 177-182.
- Negi, V.S., Borthakur, D. (2016) Heterologous expression and characterization of mimosinase from *Leucaena leucocephala*. In: Fett-Neto A. (eds) Biotechnology of Plant Secondary Metabolism. Methods in Molecular Biology, vol 1405. Humana Press, New York, NY.
- Nguyen, B.C.Q., Tawata, S. The chemistry and biological activities of mimosine: a review. Phytotherapy Research 30 (2016): 1230-1242.
- Nokihara, K., Hirata, A., Sogon, T., Ohyama, T. Preparative scale isolation, purification and derivatization of mimosine, a non-proteinogenic amino acid. Amino Acids 43 (2012): 475-482.
- Notation, A.B. Synthesis and biosynthesis of mimosine. Tese (Doutorado em Química) – McMaster University, Hamilton, Ontario, 1963.
- Paul, S.S. Detoxification of mimosine and dihydroxypyridone: a Review. The Agricultural History Review 21 (2000): 104-109.

- Perry, C., Sastry, R., Nasrallah, I.M., Stover, P.J. Mimosine attenuates serine hydroxymethyltransferase transcription by chelating zinc: implications for inhibition of DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005): 396-400.
- Picherksy, E., Gang, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 5 (2000): 439-445.
- Renz, J. Über das mimosina. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 244 (1936): 153-158.
- Schläger, S., Dräger, B. Exploiting plant alkaloids. *Current Opinion in Biotechnology* 37 (2016): 155-164.
- Socaciu, C. Food colorants: Chemical and functional properties. Taylor & Francis, 2008.
- Spencer, I.D., Notation, A.D. A synthesis of mimosine. *Canadian Journal of Chemistry* 40 (1962): 1374-1379.
- Suda, S. On the physiological properties of mimosine. *Botanical Magazine Tokyo* 73 (1960): 142-148.
- Theis, N., Lerchau, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164 (2003): 93-102.
- Vestena, S., Fett-Neto, A.G., Duarte, R.C., Ferreira, A.G. Regulation of mimosine accumulation in *Leucaena leucocephala* seedlings. *Plant Science* 161 (2001): 597-604.
- Vogt, G., Qunitio, E.T., Pascual, F.P. *Leucaena leucocephala* leaves in formulated feed for *Penaeus monodon*: a concrete example of the application of histology in nutrition research. *Aquaculture* 59 (1986): 209-234.
- Walton, N.J., Mayer, M.J., Narbad, A. Vanilin. *Phytochemistry* 63 (2003): 505-515.
- Wang, G., Miskimins, R., Miskimins, W.K. Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27 kip1. *Experimental Cell Research* 254 (2000): 64-71.
- Wee, K.L., Wang, S. Effect of post-harvest treatment on the degradation of mimosine in *Leucaena leucocephala* leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 39 (1987): 195-201.

Wee, K.L., Wang, S. Nutritive value of leucaena leaf meal in pelleted feed for Nile tilapia. *Aquaculture* 62 (1986): 97-108.

Wink M. A Short history of alkaloids. in: Roberts M.F., Wink M. *Alkaloids*. Springer, Boston, MA (1998): 11-44.

Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 63 (2003): 3-19.

Wink, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 89 (2013): 164-175.

Xuan, T.D., Elzaawely, A.A., Deba, F., Fukuta, M., Tawata, S. Mimosine in leucaena as a potent bio-herbicide. *Agronomy for Sustainable Development* 26 (2006): 89-97.

Xuan, T.D., Tawata, S., Khanh, T.D. Herbicidal activities of mimosine and its derivatives. *Herbicidal – Advances in Research* (2013), Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, 299-312.