

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**METABOLISMO DE DAIDZEINA E GENISTEINA**  
**POR *Spodoptera frugiperda***

**DANILO DA COSTA FRANCO\***

Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção  
do título de MESTRE em  
QUÍMICA, área de concentração:  
QUÍMICA ORGÂNICA

**Orientador: Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters**

**\*bolsista (CNPq)**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2021**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Danilo da Costa Franco, realizada em 20/09/2021.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Prof. Dr. Celio Fernando Figueiredo Angolini (UFABC)

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*“Se você aceitar tudo o que é dito, sem  
qualquer dúvida, eventualmente, perderá  
a capacidade de pensar.”*

(Pandora Hearts)

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Franco e Luzia Silva, e a todos meus familiares pelo apoio durante minha formação. Em especial, a Flávia Pimenta e ao Rodrigo Santos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela saúde e por sempre estar cuidando de mim.

Aos meus pais, Luiz Franco e Luzia Silva, e ao meu irmão Daniel Franco, pela confiança e apoio emocional.

À Flavia Pimenta e Rodrigo Santos, pelo grande apoio e confiança durante essa trajetória.

À minha namorada, Helena Alves, pelo carinho, motivação e companhia.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Christoff Wouters, pela orientação, paciência e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Regina Vincenzi Oliveira, pelo auxílio durante as análises de LC-MS e o tratamento dos dados.

Aos colegas e amigos do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar pela ajuda com os equipamentos e convivência no laboratório durante o mestrado. Em especial, à Josi, Victoria, Lilian, Jennifer, Diane, Airton, Doraí, Aylon, Jéssica, Gabriel, Igor, Luís, Luciano e Arthur.

Aos professores do Departamento de Química pelos seus conhecimentos compartilhados.

Aos órgãos de fomentos, CAPES, FAPESP e principalmente ao CNPq pela contribuição financeira durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do IFPI *campus* Parnaíba, pela motivação e apoio inicial para a realização do mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Química. Em especial, às secretárias que sempre estavam dispostas a ajudar com o que precisássemos e as funcionárias da limpeza por sempre manter um ambiente limpo e agradável.

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Diferentes classes químicas que atuam como defesa vegetal.....	3
<b>Tabela 2</b> - Gradiente exploratório para otimização do método de isolamento... 19	19
<b>Tabela 3</b> - Gradiente para análise do metabolismo de isoflavonas por LC-MS.. .....	22
<b>Tabela 4</b> - Perfil químico de isoflavonas no extrato do produto comercial.....	27
<b>Tabela 5</b> - Dados de deslocamento de RMN <sup>1</sup> H da substância daidzeína, comparados a dados encontrados na literatura. ....	35
<b>Tabela 6</b> - Dados de deslocamento de RMN <sup>1</sup> H da substância Genisteína, comparados a dados encontrados na literatura. ....	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema geral do metabolismo de xenobióticos em insetos.....	7
<b>Figura 2</b> - Principais pragas da soja em seus diferentes estágios de desenvolvimento. ....	10
<b>Figura 3</b> - <i>Spodoptera frugiperda</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	11
<b>Figura 4</b> - Principais flavonoides presentes em folhas de soja. ....	13
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática dos bioensaios com larvas de <i>S. frugiperda</i> de instares iniciais e 3º instar.....	21
<b>Figura 6</b> - Cromatogramas das isoflavonas encontradas no extrato do produto comercial à base de soja. ....	25
<b>Figura 7</b> - Estruturas das isoflavonas de soja encontradas no produto comercial. ....	26
<b>Figura 8</b> - Comparação dos cromatogramas de íons extraídos da daidzeína e derivados.....	27
<b>Figura 9</b> - Esquema de biotransformação sugerido para a isoflavona daidzeína. ....	29
<b>Figura 10</b> - Comparação dos cromatogramas de íons extraídos da genisteína e derivados.....	29
<b>Figura 11</b> - Espectrograma de massas do composto 1 derivado da genisteína encontrado nas fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial contendo o produto comercial.....	30
<b>Figura 12</b> - Espectrograma de massas do composto 2 derivado da genisteína encontrado nas fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial contendo o produto comercial.....	31
<b>Figura 13</b> - Comparação dos cromatogramas de íons extraídos da gliciteína e derivados.....	32
<b>Figura 14</b> – Cromatograma analítico dos compostos separados do extrato do produto comercial à base de soja. ....	33

<b>Figura 15</b> - Cromatograma semipreparativo de isolamento das duas principais isoflavonas da soja. ....	34
<b>Figura 16</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H e estrutura da substância daidzeína (400 MHz, DMSO-d <sup>6</sup> ). ....	36
<b>Figura 17</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H e estrutura da substância genisteína (400 MHz, DMSO-d <sup>6</sup> ). ....	38
<b>Figura 18</b> - Espectro de ultravioleta da daidzeína. ....	39
<b>Figura 19</b> - Espectro de ultravioleta da genisteína. ....	39
<b>Figura 20</b> - Cromatograma da isoflavona daidzeína isolada. ....	40
<b>Figura 21</b> - EIC e espectro de massas da daidzeína nas fezes de <i>S. frugiperda</i> . ....	41
<b>Figura 22</b> - Cromatograma da isoflavona genisteína isolada. ....	42
<b>Figura 23</b> - EIC e espectros de massas da genisteína e do novo composto presentes nas fezes de <i>S. frugiperda</i> . ....	43
<b>Figura 24</b> - Comparação dos EICs do novo composto com genistina. ....	44
<b>Figura 25</b> - Espectros de massas (MS <sup>2</sup> ) correspondente ao novo composto encontrado nas fezes das lagartas. ....	45
<b>Figura 26</b> - Esquema representativo para o metabolismo da isoflavona genisteína encontrada nas fezes de <i>S. frugiperda</i> . ....	46

## RESUMO

METABOLISMO DE DAIDZEINA E GENISTEINA POR *Spodoptera frugiperda*. Como organismos sésseis, as plantas não podem fugir dos muitos ataques de herbívoros que ocorrem ao longo de seu desenvolvimento, e dependem de estratégias alternativas para reduzir ou evitar esses ataques como, por exemplo, a produção de metabólitos secundários tóxicos. Porém, vários insetos apresentam adaptações que os permitem se alimentar de plantas bem-defendidas quimicamente. Nessa perspectiva, a soja (*Glycine max* (L) Merrill), uma planta leguminosa pertencente à família Fabaceae, produz diversos flavonoides conhecidos por causarem danos em insetos herbívoros. Apesar disso, a soja é atacada por uma variedade de insetos ao longo do seu desenvolvimento, dentre os quais se destaca a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Embora seja considerada uma praga secundária de soja, essa espécie se destaca por ser capaz de atacar a soja em seus estágios iniciais de desenvolvimento, causando danos severos à planta. Plântulas de soja possuem concentrações relativamente altas de isoflavonas, e a capacidade de *S. frugiperda* de se alimentar desse estágio da planta pode estar associado com a habilidade de metabolizar e detoxificar eficientemente essa classe de compostos. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo investigar como *S. frugiperda* metaboliza daidzeína e genisteína, as duas principais isoflavonas da soja. Lagartas de terceiro instar foram utilizadas em ensaios de alimentação com dietas artificiais acrescidas das duas isoflavonas, as quais foram isoladas de extratos de soja comerciais. Amostras das fezes excretadas durante os bioensaios individuais com as isoflavonas, foram coletadas e analisadas por LC-MS. Nas fezes de *S. frugiperda* alimentadas de dieta contendo daidzeína, foi detectada somente daidzeína não modificada e nos bioensaios com genisteína, a presença de um novo metabólito derivado de genisteína foi observada. O qual foi identificado como um monoglicosídeo de genisteína diferente da genistina (genisteína 7-O-glicosídeo). Esses resultados sugerem que *S. frugiperda* metaboliza extensivamente a isoflavona genisteína, ao contrário de daidzeína. Por fim, esse trabalho foi o primeiro a investigar sobre o metabolismo de isoflavonas por *S. frugiperda*, contribuindo para o entendimento sobre essa espécie e sua capacidade de metabolizar compostos bioativos, cujo achados podem servir como base para futuros estudos que pretendem compreender o status de inseto-praga dessa espécie ou do gênero *Spodoptera*.

**Palavras-chave:** isoflavonas; daidzeína; genisteína; *Spodoptera frugiperda*; soja.

## ABSTRACT

DAIDZEIN AND GENISTEIN METABOLISM BY *Spodoptera frugiperda*. As sessile organisms, plants cannot escape the many herbivore attacks that occur throughout their development, and rely on alternative strategies to reduce or prevent these attacks, such as the production of toxic secondary metabolites. However, many insects have adaptations that allow them to feed on chemically well-defended plants. In this perspective, soybean (*Glycine max* (L) Merrill), a leguminous plant belonging to the Fabaceae family, produces several flavonoids known to damage herbivorous insects. Despite this, soybean is attacked by a variety of insects throughout its development, among which the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) stands out. Although it is considered a secondary soybean pest, this species stands out for being able to attack soybeans in their early stages of development, causing severe damage to the plant. Soybean seedlings have relatively high concentrations of isoflavones, and the ability of *S. frugiperda* to feed on this stage of the plant may be associated with its ability to efficiently metabolize and detoxify this class of compounds. In this context, this work aims to investigate how *S. frugiperda* metabolizes daidzein and genistein, the two main soy isoflavones. Third instar caterpillars were used in feeding trials with artificial diets added to the two isoflavones, which were isolated from commercial soybean extracts. Feces samples excreted during the individual bioassays with the isoflavones were collected and analyzed by LC-MS. In feces from *S. frugiperda* fed a diet containing daidzein, only unmodified daidzein was detected and in bioassays with genistein, the presence of a new metabolite derived from genistein was observed. Which has been identified as a genistein monoglucoside other than genistin (genistein 7-*O*-glucoside). These results suggest that *S. frugiperda* extensively metabolizes the isoflavone genistein, as opposed to daidzein. Finally, this work was the first to investigate the metabolism of isoflavones by *S. frugiperda*, contributing to the understanding of this species and its ability to metabolize bioactive compounds, whose findings can serve as a basis for future studies that aim to understand the status of insect pest of this species or of the genus *Spodoptera*.

**Keywords:** isoflavones; daidzein; genistein; *Spodoptera frugiperda*; soybean.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Princípios de Defesa das plantas .....</b>	<b>2</b>
<i>1.1.1. Defesas químicas das plantas.....</i>	<i>3</i>
<b>1.2. Adaptações dos insetos.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Soja (<i>Glycine max</i>).....</b>	<b>8</b>
<i>1.3.1. Principais insetos-praga da soja.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2. Lagarta do cartucho (<i>Spodoptera frugiperda</i>, J. E. Smith).....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3. Flavonoides como defesas químicas da soja .....</i>	<i>12</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Materiais.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Obtenção e criação dos insetos .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Dieta artificial.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Bioensaios iniciais com produto comercial incorporado à dieta.....</b>	<b>17</b>
<b>3.5. Extração e isolamento de isoflavonas de soja .....</b>	<b>18</b>
<i>3.5.1. Procedimento de extração.....</i>	<i>18</i>
<i>3.5.2. Purificação de isoflavonas.....</i>	<i>18</i>
<b>3.6. Bioensaios com as duas isoflavonas incorporadas na dieta.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7. Extração das fezes e análises por LC-MS .....</b>	<b>21</b>
<i>3.7.1. Procedimento de extração.....</i>	<i>21</i>
<i>3.7.2. Análises cromatográficas e espectrométricas .....</i>	<i>22</i>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Bioensaios iniciais.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Isolamento e caracterização das Isoflavonas .....</b>	<b>32</b>
<i>4.2.1. Caracterização da daidzína e genisteína .....</i>	<i>34</i>
<b>4.3. Bioensaios com as isoflavonas isoladas .....</b>	<b>40</b>

<i>4.3.1. Análise dos metabólitos encontrados nas fezes das lagartas alimentadas com daidzeína .....</i>	<i>40</i>
<i>4.3.2. Análise dos metabólitos encontrados nas fezes das lagartas alimentadas com genisteína .....</i>	<i>42</i>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A coevolução entre plantas e insetos herbívoros, ocorre há mais de 400 milhões de anos. Durante esse tempo, as plantas desenvolveram a capacidade de resistir ao ataque desses inimigos naturais através da produção de defesas físicas e químicas (PRICE *et al.*, 2011; MITHÖFER e BOLAND, 2012). Os metabólitos secundários, os quais pertencem ao arsenal de defesas químicas, são importantes fatores de resistência de plantas contra esses fitófagos, devendo-se à grande diversidade e eficácia desses compostos (PENTZOLD *et al.*, 2014; SPEED *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2021).

A soja produzida no Brasil, a qual possui grande importância econômica para o país, está entre as culturas domesticadas que mais sofrem ameaças por insetos-praga, dentre os quais estão as lagartas do gênero *Spodoptera* (OLIVEIRA *et al.*, 2014; BUENO *et al.*, 2017; CATTELAN e DALL'AGNOL, 2018). Entretanto, essa leguminosa consegue muitas vezes reduzir o número de ataques sofridos, produzindo metabólitos secundários pertencentes à classe dos flavonoides (PIUBELLI *et al.*, 2003; MURAKAMI *et al.*, 2014). Por outro lado, insetos-praga também desenvolveram adaptações, que mitigam as defesas químicas produzidas pelas plantas (MITHÖFER e BOLAND, 2012).

Por se alimentarem de plântulas de soja (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2012), espera-se que as lagartas de *S. frugiperda* estejam expostas a uma maior concentração de isoflavonas, refletindo no perfil químico da planta nos seus estágios iniciais (GRAHAM, 1991). Além disso, a forte indução de isoflavonas resultante de ataque de herbívoros, sugere o envolvimento dessa subclasse de compostos na defesa da planta contra esses inimigos naturais (PIUBELLI *et al.*, 2003; WEGULO *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2011; MURAKAMI *et al.*, 2014). Porém, pouco se sabe sobre a toxicidade de isoflavonas em lagartas e seu metabolismo nesses insetos. Se lagartas de *S. frugiperda* são capazes de se alimentar de tecidos vegetais com alto teor de isoflavonas, é possível que essa espécie apresente rotas metabólicas para a detoxificação desses compostos.

Diante disso, nesse trabalho, foi investigado o metabolismo das principais isoflavonas da soja, daidzeína e genisteína, através de bioensaios com lagartas de *S. frugiperda* alimentadas de dieta artificial contendo esses compostos, bem como realizar o isolamento dessas duas agliconas a partir de um extrato de soja comercial.

## **1.1. Princípios de Defesa das plantas**

Durante todo o seu ciclo de vida, as plantas estão sujeitas a uma variedade de estresses abióticos e bióticos na natureza (MITHÖFER e BOLAND, 2012; ERB e REYMOND, 2019) e para lidar com esses estresses, elas desenvolveram mecanismos físicos e químicos de defesas ao longo de sua evolução (KONNO *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2018; MERTENS *et al.*, 2021).

Organismos heterotróficos que usam plantas como fonte de alimento são particularmente responsáveis pelos estresses bióticos (MITHÖFER e BOLAND, 2012). Entre eles, estão os insetos que, devido a sua abundância e diversidade, são as ameaças mais proeminentes à sobrevivência das plantas (ERB e REYMOND, 2019). Nessa perspectiva, visando uma dieta rica em nutrientes, os insetos herbívoros usam táticas para se alimentar de diferentes partes da planta, tanto acima quanto abaixo do solo (HOWE e JANDER, 2008). Em resposta, as plantas contam com um arsenal de defesas físicas e químicas para se proteger contra esses inimigos naturais.

Em termos de definição, a defesa vegetal pode ser atribuída a qualquer fator capaz de aumentar a aptidão da planta em ambientes na presença de herbívoros, uma vez que suas características se distribuem em três grandes categorias: resistência, tolerância e prevenção (JOHNSON *et al.*, 2015). Com isso, a herbivoria pode ser impedida tanto por barreiras físicas que estão relacionadas com as estruturas mecânicas, como ceras cuticulares, tricomas e espinhos, quanto por compostos químicos tóxicos liberados pelas plantas que a possibilitam uma defesa adicional e eficaz (PENTZOLD *et al.*, 2014).

### 1.1.1. Defesas químicas das plantas

Diante dos desafios ecológicos específicos, foi estimado que as plantas desenvolveram a capacidade de produzir mais de 200.000 metabólitos especializados (PICHERSKY e LEWINSOHN, 2011; MITHÖFER e BOLAND, 2012), e muitos desses estão envolvidos na defesa vegetal por possuir efeitos nocivos em herbívoros, patógenos e plantas competidoras (WINK, 2003; MITHÖFER e BOLAND, 2012; MAAG *et al.*, 2015). Entre essas diferentes moléculas bioativas está um grande grupo de compostos orgânicos com baixo peso molecular que pertencem a diversas classes químicas, como terpenoides, alcaloides, cardenólídeos, compostos fenólicos, glucosinolatos, entre outros (DESPRES *et al.*, 2007; MITHÖFER e BOLAND, 2012; DANG e VAN DAMME, 2015). Na **Tabela 1** é apresentado algumas dessas classes que atuam como defesas químicas nas plantas e seus respectivos modos de ação.

**Tabela 1** - Diferentes classes químicas que atuam como defesa vegetal (adaptado de DESPRES *et al.*, 2007; MITHÖFER e BOLAND, 2012).

<b>Classes</b>	<b>Modos de ação</b>
<b>Alcaloides</b>	<i>Inibição de receptores neurais, deterrência</i>
<b>Benzoxazinóides</b>	<i>Reações com nucleófilos presentes no meio biológico</i>
<b>Cardenólídeos</b>	<i>Inibição de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases</i>
<b>Flavonoides</b>	<i>Inibição enzimática, deterrência, dano por estresse oxidativo</i>
<b>Glicosídeos cianogênicos</b>	<i>Inibição de citocromo oxidases mitocondriais, acompanhado de liberação de CN<sup>-</sup></i>
<b>Glucosinolatos</b>	<i>Reações com nucleófilos presentes no meio biológico, diminuição dos estoques de glutatona</i>
<b>Terpenoides</b>	<i>Inibição de receptores neurais, deterrência</i>

As defesas químicas de plantas podem ser classificadas em constitutivas e induzidas (KARBAN e BALDWIN, 2007; FROST *et al.*, 2008). Enquanto as defesas constitutivas estão sempre presentes no tecido vegetal em níveis relativamente constantes, as induzidas necessitam de mecanismos específicos de ativação para serem produzidas, por exemplo, danos causados por insetos (FROST *et al.*, 2008; MITHÖFER e BOLAND, 2012). Essas diferentes estratégias permitem às plantas utilizar seus recursos de maneira mais eficiente e evitar gastos desnecessários de energia, uma vez que diferentes herbívoros causam diferentes danos às plantas (WITTSTOCK *et al.*, 2002).

Por outro lado, as estratégias defensivas mencionadas acima podem afetar o desenvolvimento e o crescimento dos herbívoros de forma direta (defesa direta) e/ou indireta (defesa indireta) (ARIMURA *et al.*, 2009., MITHÖFER e BOLAND, 2012). Defesas diretas são aquelas que afetam a biologia do herbívoro, causando danos à sua estrutura fisiológica por meio de compostos tóxicos ou dificultando sua alimentação por meios físicos, como o desenvolvimento de tricomas contendo toxinas na superfície das folhas (KHAN *et al.*, 1986; HANLEY *et al.*, 2007). Os mecanismos de defesa indireta são focados em atrair inimigos naturais dos herbívoros, fornecendo alimento (néctar extrafloral) e/ou habitação (WAR *et al.*, 2012). São baseados em sua grande maioria na produção e liberação de mistura de voláteis, que irão atrair predadores e/ou parasitoides do herbívoro através do aroma (RAMACHANDRAN *et al.*, 1991; ARIMURA *et al.*, 2009).

A defesa vegetal não está restrita a somente moléculas orgânicas, e compostos inorgânicos também podem atuar como barreiras defensivas que dificultam a alimentação de herbívoros. Por exemplo, o dióxido de silício afeta a absorção de nutrientes pelo herbívoro, causando uma redução no crescimento, além de aumentar o desgaste das mandíbulas dos insetos (MASSEY e HARTLEY, 2009).

É importante salientar que entre os compostos químicos tóxicos que as plantas sintetizam para se defender dos diversos ataques de insetos, existem

substâncias que também apresentam toxicidade para a própria planta. Por isso, essas toxinas são armazenadas na forma de glicosídeos inativos e não tóxicos separados espacialmente das enzimas bioativadoras (JONES e VOGT, 2001; PENTZOLD *et al.*, 2014). Após a herbivoria, os danos causados pela mastigação no tecido vegetal levam esses compostos de defesas glicosilados a entrar em contato com as enzimas ativadoras, resultando na liberação de agluconas tóxicas (PENTZOLD *et al.*, 2014). Esse mecanismo de defesa vegetal, no qual um dos componentes é quimicamente inerte quando separados, é conhecido como sistema de dois componentes (MORANT *et al.*, 2008).

No entanto, essas estratégias de defesa não são suficientes para impedir os diversos ataques realizados pelos insetos, devido a capacidade que esses fitófagos possuem para se adaptar precisamente às respostas defensivas de suas plantas hospedeiras (DESPRES *et al.*, 2007).

## **1.2. Adaptações dos insetos**

Os insetos herbívoros estão expostos a ambientes quimicamente desafiadores ou tóxicos de suas plantas hospedeiras, no qual precisam sobreviver (HEIDEL-FISCHER e VOGEL, 2015). Para isso desenvolveram adaptações para superar as estratégias defensivas das plantas ou usá-las para seu próprio benefício (ODE, 2006; DESPRES *et al.*, 2007; OPITZ e MÜLLER, 2009; ERB e REYMOND, 2019).

Com base em sua preferência por plantas hospedeiras, os insetos herbívoros podem ser classificados em um espectro entre dois extremos: especialistas e generalistas (ALI e AGRAWAL, 2012; WAR *et al.*, 2018). Enquanto os insetos especialistas (oligófagos e monófagos) se alimentam apenas de um número limitado de espécies de plantas, ou até mesmo de um único hospedeiro, os generalistas (polífagos) podem se alimentar de várias plantas hospedeiras de diferentes famílias (HOWE e JANDER, 2008; WINDE e WITTSTOCK, 2011; MITHÖFER e BOLAND, 2012). Sendo assim, os mecanismos desenvolvidos por

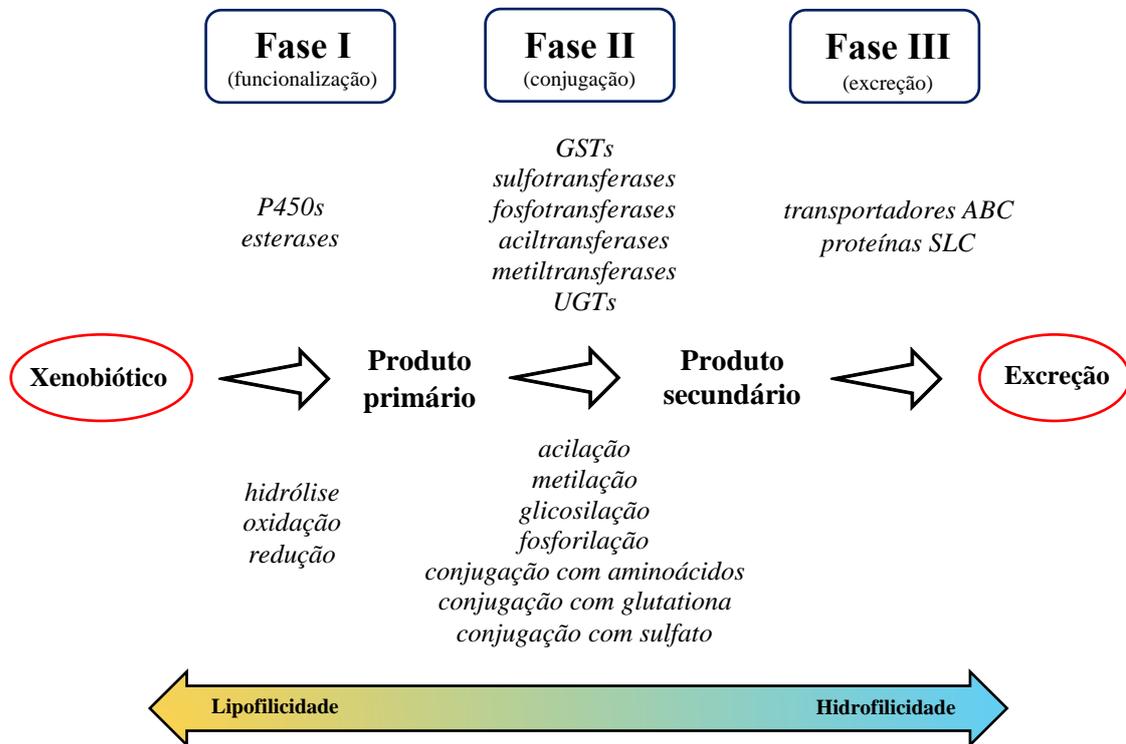
cada inseto para minimizar a toxicidade de defesas de plantas dependem da sua posição nesse espectro. Muitas vezes é considerado que os insetos generalistas possuem uma maior capacidade de detoxificar aleloquímicos vegetais (defesas químicas) por encontrar uma ampla gama de toxinas em sua dieta (LI *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2016).

As estratégias utilizadas pelos insetos para evitar ou reduzir a toxicidade de defesas de plantas podem ser classificadas em adaptações comportamentais, morfológicas e bioquímicas (WAR e SHARMA, 2014). Entre essas estratégias, as adaptações bioquímicas se destacam por envolver rotas metabólicas, cujo objetivo é reduzir a exposição de toxinas aos tecidos vulneráveis do inseto, tais como: excreção rápida, sequestro, detoxificação, resistência metabólica, caminhos enzimáticos alternativos (que buscam minimizar a toxicidade das moléculas), entre outras (SORENSEN e DEARING, 2006; OPITZ *et al.*, 2010; WAR e SHARMA, 2014; WOUTERS *et al.*, 2014; HEIDEL-FISCHER e VOGEL, 2015).

Os insetos herbívoros podem metabolizar as toxinas vegetais e sintéticas através da detoxificação xenobiótica, que consiste na conversão de substâncias lipossolúveis em metabólitos hidrossolúveis, facilitando sua excreção, e geralmente diminuindo sua toxicidade (BERENBAUM e JOHNSON, 2015). O metabolismo de xenobióticos geralmente envolve três fases (**Figura 1**): Fase I (funcionalização), Fase II (conjugação) e Fase III (excreção) (KREMPL *et al.*, 2016; VAN LEEUWEN e DERMAUW, 2016).

A Fase I consiste na atividade de enzimas que alteram a estrutura do xenobiótico, tornando-o incapaz de interagir com os locais alvo lipofílicos, ou seja, introduzindo grupos reativos e polares em seus substratos (BERENBAUM e JOHNSON, 2015). Essa alteração ocorre por meio de reações de hidrólise, oxidação e redução (CHAHINE e O'DONNELL, 2011; KENNEDY e TIERNEY, 2013). As principais enzimas responsáveis por essas reações na Fase I são, monoxigenases dependentes do citocromo P450 e carboxilesterases

(BERENBAUM e JOHNSON, 2015). Nesta fase, os produtos formados (produto primário) apresentam polaridade maior do que a molécula original, aumentando o potencial de excreção, além de torná-los adequados para as reações enzimáticas da fase II (KENNEDY e TIERNEY, 2013).



**Figura 1** - Esquema geral do metabolismo de xenobióticos em insetos (adaptado de WOUTERS, 2016).

Na Fase II, as reações envolvem a conjugação dos produtos formados na Fase I. Por exemplo, os grupos polares como açúcares, são conjugados com produtos da Fase I, tornando as moléculas mais solúveis em água e facilitando seu transporte e eliminação (DESPRES *et al.*, 2007; KENNEDY e TIERNEY, 2013). Em insetos, as glutatona-*S*-transferases (GSTs) estão entre as principais enzimas que catalisam as reações nesta fase, e desempenham um papel fundamental na detoxificação de fitotoxinas e inseticidas. Um exemplo disso ocorre com a espécie *Spodoptera littoralis*, que por meio da conjugação com glutatona consegue detoxificar os isotiocianatos formados a partir da hidrólise de glucosinolatos (LI e BERENBAUM, 2007; SCHRAMM *et al.*, 2012; JESCHKE *et al.*, 2016). Outras

enzimas da Fase II que são observadas em insetos incluem glicosiltransferases, fosfotransferases, sulfotransferases, aciltransferases, aminotransferases e glicosidases (XU *et al.*, 2013; BERENBAUM e JOHNSON, 2015).

O metabolismo da fase III consiste na excreção ou eliminação das moléculas biotransformadas na Fase I e II (BERENBAUM e JOHNSON, 2015). Os xenobióticos modificados nessas duas fases são transportados para fora das células por meio de transporte ativo que é realizado principalmente por proteínas transportadoras de soluto (SLC, do inglês, *solute carrier*) e proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*). Além disso, esses transportadores também podem atuar como uma primeira linha de defesa, evitando a entrada de toxinas na célula (KENNEDY e TIERNEY, 2013).

### **1.3. Soja (*Glycine max*)**

A soja é uma planta herbácea pertencente à família Fabaceae (ou Leguminosae) que atualmente é cultivada e consumida por muitos países em diferentes regiões do mundo, além de ser utilizada como matéria-prima para produção de biocombustíveis (KOFISKY *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2020; JUNG *et al.*, 2020). Há relatos que sua domesticação ocorreu inicialmente por volta de 6.000-9.000 anos atrás, na China (CARTER JR *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010; KOFISKY *et al.*, 2018).

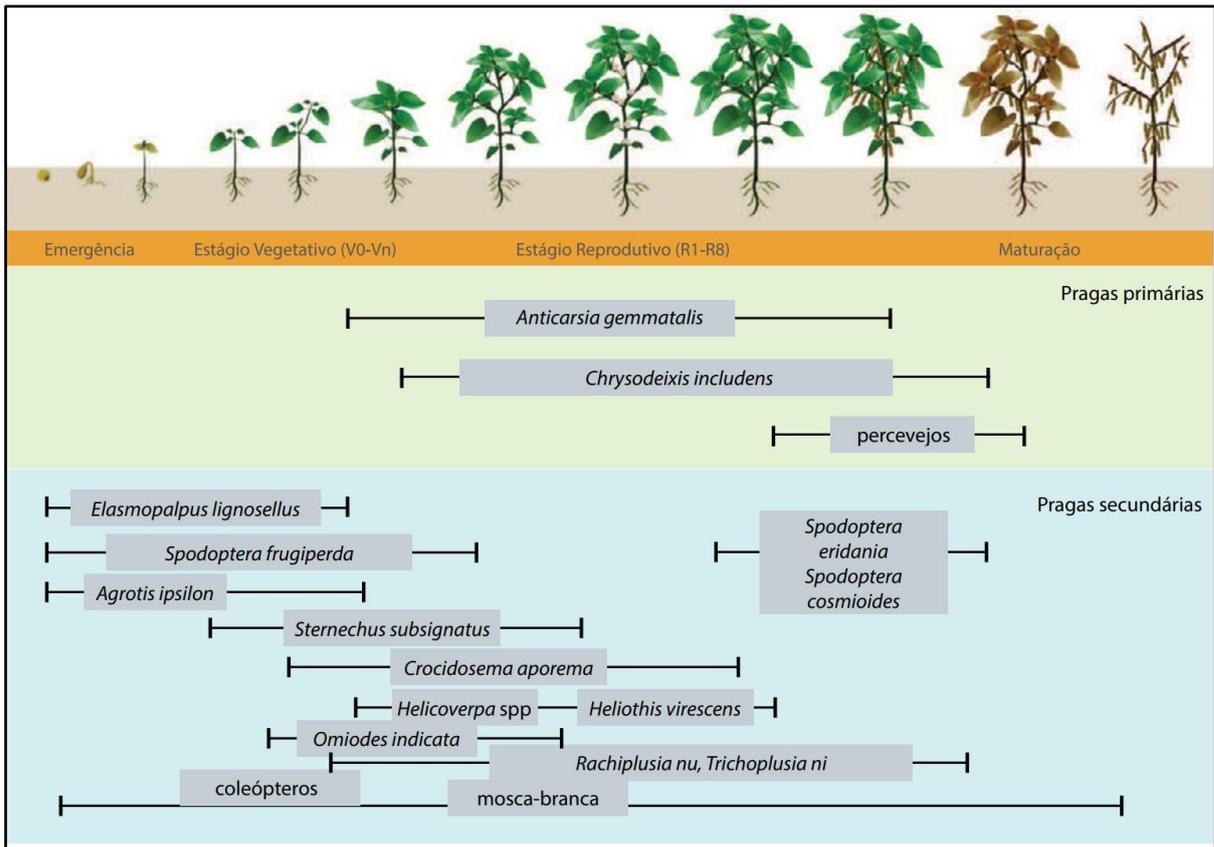
O consumo e a comercialização em larga escala dessa leguminosa têm sido associados a várias razões nutricionais que pode proporcionar benefícios potenciais à saúde, pois é uma fonte rica em óleo vegetal, proteína e compostos bioativos como isoflavonas (MUNRO *et al.*, 2003; AZAM *et al.*, 2020). As proteínas e substâncias bioativas da soja podem atuar na prevenção ou tratamento de doenças crônicas, tais como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, síndrome da menopausa, diabetes tipo II e obesidade (HE e CHEN, 2013; SPAGNUOLO *et al.*, 2015; CHATTERJEE *et al.*, 2018; AZAM *et al.*, 2020).

De acordo com dados da safra de 2019/2020, o Brasil produziu mais de 35% da produção mundial de soja, assumindo o primeiro lugar como maior produtor dessa cultura. No total, foram produzidas mais de 330 milhões de toneladas em todo mundo (*International: World soybean production*, 2019; UDSA, 2021). Entretanto, se as perdas de qualidade e quantidade causadas por pragas agrícolas fossem moderadas, essa produção poderia ser ainda maior. Em relação a insetos-praga, no Brasil, estima-se que a perda média na produção de soja é de 7,7% anualmente (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

### ***1.3.1. Principais insetos-praga da soja***

Dentre os insetos-praga economicamente relevantes que ocorrem nas lavouras de soja no Brasil, encontram-se várias espécies de lepidópteros e percevejos. Os danos causados por esses insetos à cultura da soja podem ser de origem direta (redução da produtividade) e indireta (redução da qualidade do grão) (BUENO *et al.*, 2017). Cada espécie desses fitófagos apresenta preferências quanto ao tecido e estágio da planta da qual se alimenta (**Figura 2**).

As lagartas das espécies *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* são tradicionalmente consideradas pragas primárias da soja e respondem por grande parte da desfolha causada por herbívoros em plantações de soja (BERNARDI, 2012; SCHNEIDER *et al.*, 2013). Outras espécies de lagartas como *Trichoplusia ni*, *Elasmopalpus lignosellus* e espécies do gênero *Spodoptera* são consideradas pragas secundárias ou ocasionais, mas muitas delas vem se tornando cada vez mais frequentes nas plantações. Ainda nesse contexto, as lagartas do gênero *Spodoptera* são as que mais se expandem, com ataques tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva das plantas (SCHNEIDER *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2017).



**Figura 2** - Principais pragas da soja em seus diferentes estágios de desenvolvimento (SCHNEIDER et al., 2013).

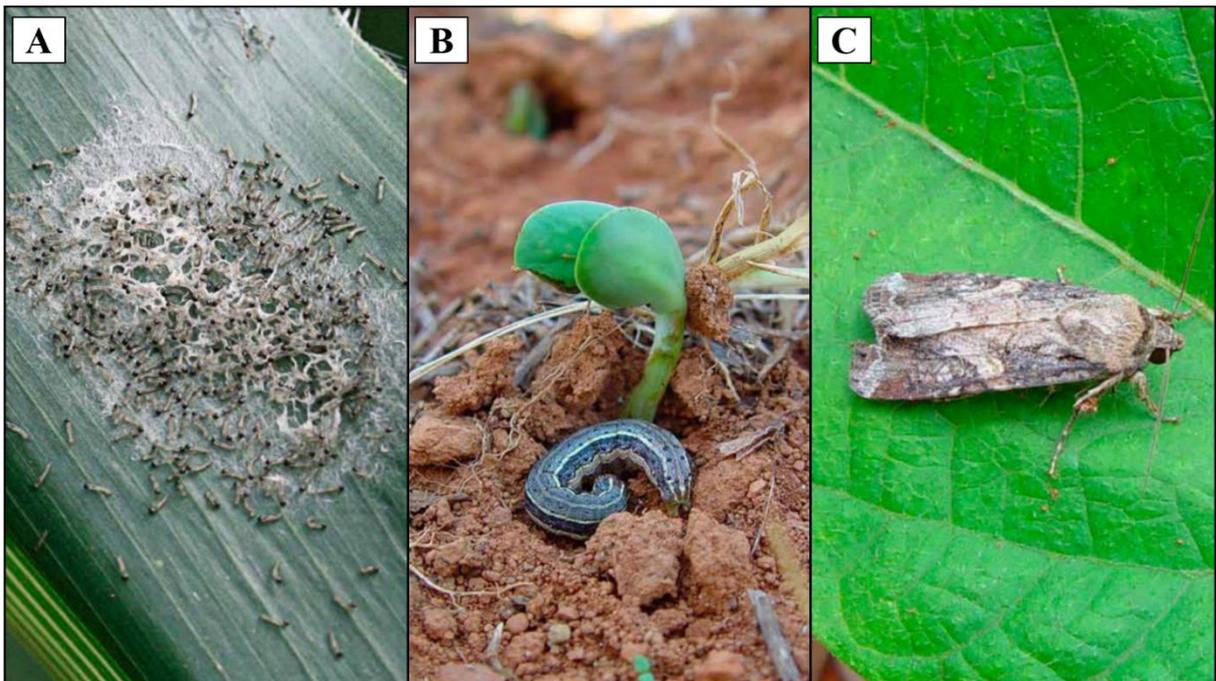
### 1.3.2. Lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*, J. E. Smith)

No estágio de larvas, a espécie *Spodoptera frugiperda* (**Figura 3**) conhecida comumente no Brasil como lagarta do cartucho ou lagarta militar, pode atacar uma variedade de espécies de plantas cultivadas (CASMUZ et al., 2010; HOFFMANN-CAMPO et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2013). No entanto, é observado um maior dano em gramíneas como milho e sorgo, seus principais hospedeiros, e monoculturas como soja e algodão (BUENO et al., 2011; MONTEZANO et al., 2018).

Em um estudo com o objetivo de organizar os registros de plantas hospedeiras de *S. frugiperda*, foi constatado que esse inseto possui a capacidade de se alimentar de mais de 350 espécies de plantas pertencentes a 76 famílias vegetais (MONTEZANO et al., 2018). Essa grande amplitude de hospedeiros

contribui para a persistência dessa praga polífaga ao longo do ano, tanto em plantas cultivadas no verão como em plantas de cobertura na entressafra.

De acordo com Smith (1797), a *S. frugiperda* é uma espécie pertencente ao Reino: Animal; Filo: Arthropoda; Classe: Insecta; Ordem: Lepidoptera; Família: Noctuidae; Gênero: *Spodoptera*; Espécie: *Spodoptera frugiperda*. O ciclo de desenvolvimento desse fitofágo é do tipo holometabólico, compreendendo as fases de ovo, larva, pupa e mariposa (adulto) (SARMENTO *et al.*, 2002).



**Figura 3** - *Spodoptera frugiperda* em diferentes fases de desenvolvimento: massa de ovos e lagartas recém-nascidas (A); lagarta estágio final (B); adulto (C) (adaptado de MOREIRA e ARAGÃO, 2009).

Os insetos adultos são mariposas de hábitos noturnos. Durante o período de oviposição, as fêmeas depositam até 2000 ovos na face superior da folha e depois os cobrem com escamas e pelos que retiram do próprio corpo (SARMENTO *et al.*, 2002; MOREIRA e ARAGÃO, 2009). Embora seja observado posturas com grande quantidade de ovos, geralmente encontra-se uma ou duas lagartas grandes por planta, o que se deve à alta densidade populacional e comportamento canibal das larvas em plantações. A duração do período larval desse inseto pode variar conforme a disponibilidade de alimentos e condições térmicas ambientais. Em

média, essa fase pode durar entre 15 e 30 dias, podendo compreender até sete instares (CAPINERA, 1999; MARTINS e DA ROSA, 2007).

Nas plantações de soja, a lagarta do cartucho é considerada uma praga secundária ou ocasional, porém pode causar danos equivalentes ou até maiores que a principal praga da soja, *A. gemmatilis* (BUENO *et al.*, 2011). Inicialmente alimentam-se das folhas, passando a consumir as vagens conforme a planta entra nos estágios reprodutivos (BARROS *et al.*, 2010). Em contraste com outras espécies que também atacam a soja, a *S. frugiperda* possui a capacidade de se alimentar de estágios muito jovens da planta (exemplo: plântulas), o que acentua ainda mais a perda da área fotossintética, aumentando os prejuízos econômicos (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2012).

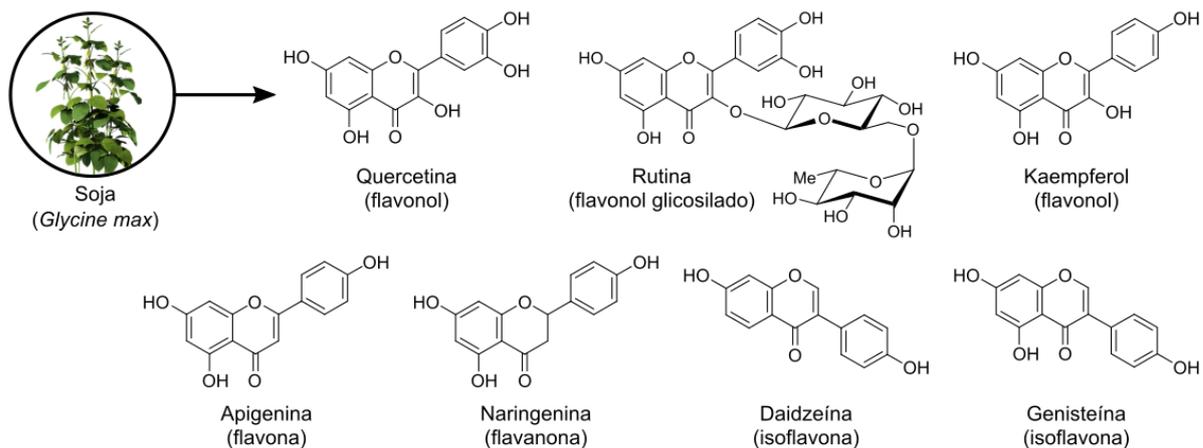
Segundo Degrande e Vivan (2010), na cultura de soja, a ocorrência dos surtos mais intensos da lagarta do cartucho geralmente estão associados a períodos mais secos. Algumas vezes, a *S. frugiperda* pode ser confundida com a lagarta-roscas (*Agrotis ipsilon*) por causar danos semelhantes nas lavouras. Por exemplo, as duas espécies cortam as plântulas de soja rente ao solo (causando a morte da planta) e são encontradas no solo durante o dia, sob torrões e restos culturais (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2012).

### ***1.3.3. Flavonoides como defesas químicas da soja***

Os flavonoides são uma importante classe de metabólitos bioativos que estão amplamente distribuídos no reino vegetal, eles são divididos em muitas subclasses, como flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas (NAKATA *et al.*, 2016). Alguns padrões comuns de substituição como glucosilação, metilação e prenilação são conhecidos por proporcioná-los complexidade e diversidade estrutural (YANG *et al.*, 2018). Esses compostos estão envolvidos em várias funções nas plantas, tais como moduladores hormonais, inibidores enzimáticos, pigmentos que atraem polinizadores, antioxidantes e proteção contra insetos,

patógenos e radiação ultravioleta (GOULD e LISTER, 2006; MATHESIUS, 2018).

Nesse contexto, embora a soja não apresente metabólitos secundários específicos e potentes como os presentes em outras famílias de plantas (como glucosinolatos em Brassicaceae e benzoxazinóides em Poaceae), ela acumula diversos flavonoides em seus tecidos (**Figura 4**). Assim, dependendo da concentração dessas substâncias na soja, elas podem atuar como deterrentes, atraentes, repelentes e fitotoxinas contra micro-organismos patogênicos e insetos herbívoros (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2001; PIUBELLI *et al.*, 2005).



**Figura 4** - Principais flavonoides presentes em folhas de soja.

Em um estudo comparativo entre extratos de cultivares de soja resistentes e suscetíveis à herbivoria, os quais foram adicionados à dieta artificial, as frações que mais prejudicaram larvas da espécie *Trichoplusia ni* (diminuindo o peso da pupa e causando maior percentual de mortalidade) continham rutina, quercetina 3-*O*-glucosilgalactosídeo e genisteína 7-*O*-glucosídeo (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram observados para *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* em bioensaios com dieta contendo rutina e quercetina (PIUBELLI *et al.*, 2005; HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2016; NEGRA, 2019).

O perfil de metabólitos da planta de soja varia ao longo do seu desenvolvimento. Nos primeiros estágios de vida, logo após a germinação, os metabólitos presentes em maior quantidade em todos os tecidos são conjugados das isoflavonas genisteína e daidzeína. Porém, após três dias da germinação, os flavonoides quercetina, kaempferol, isorhamnetina e seus glicosídeos começam a se acumular nas folhas (GRAHAM, 1991). Já no hipocótilo, as concentrações e tipos de compostos se mantêm constantes durante quase todo o período em que a planta é jovem, estando presentes majoritariamente genisteína e daidzeína. Outros fatores abióticos, como estresse hídrico e exposição à luz, também podem influenciar o perfil das moléculas encontradas em cada tecido (GRAHAM, 1991).

Além de estarem presentes em maiores quantidades durante os estágios iniciais da planta, as isoflavonas daidzeína, genisteína e formononetina (bem como seus conjugados glicosilados e malonilglicosilados) são induzidas em folhas de soja após a inoculação com bactérias e fungos fitopatogênicos (MURAKAMI *et al.*, 2014). A indução dessa subclasse de compostos também é observada localmente em sementes imaturas de soja como resposta ao dano causado pelo percevejo *Nezara viridula* (PIUBELLI *et al.*, 2003) e em folhas após herbivoria pela lagarta *Spodoptera litura* ou a aplicação de suas secreções orais (MURAKAMI *et al.*, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Esse trabalho tem como objetivo geral investigar como as lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* metabolizam daidzeína e genisteína, as duas principais isoflavonas da soja.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar bioensaios de alimentação com lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com isoflavonas da soja;
- Isolar as isoflavonas (daidzeína e genisteína) de extratos de soja comerciais;
- Analisar por LC-MS/MS os produtos do metabolismo de daidzeína e genisteína excretados por *S. frugiperda*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

O extrato de soja utilizado como fonte de isoflavonas nesse trabalho foi o ISOFLAVINE<sup>®</sup> - 150 mg (Extrato hidroalcolico seco de *Glycine max* (L.) Merr. padronizado em 40% de isoflavonas), comercializado na forma de comprimidos. Esse produto foi obtido em drogarias locais (São Carlos, SP) durante o ano de 2020.

Para a extração das isoflavonas foram utilizados metanol (destilado no DQ-UFSCar) e água ultrapura deionizada (LC-PARK, Direct-Q) como solventes extratores. Já para as análises cromatográficas, foram usados os solventes de grau HPLC acetonitrila (TEDIA, High Purity Solvents), ácido fórmico (Sigma-Aldrich, Fluka Analytical) e água deionizada (LC-PARK, Direct-Q). Durante a otimização do método, outros solventes foram usados em microextrações, tais como: acetato de etila, etanol e acetona.

#### **3.2. Obtenção e criação dos insetos**

Ovos de *S. frugiperda* foram obtidos comercialmente através da empresa PROMIP – Programa de Manejo Integrado de Pragas (Engenheiro Coelho – SP). Após a eclosão, as lagartas foram mantidas em dieta artificial à base de farinha de feijão branco (descrita abaixo) até que atingissem o terceiro instar, com uma massa aproximada de 50 mg por lagarta. Os insetos foram mantidos em câmara incubadora do tipo BOD em condições controladas de temperatura e fotoperíodo ( $25 \pm 1$  °C; ciclo de 12:12 h, luz/escuro) e a dieta foi trocada a cada dois dias.

#### **3.3. Dieta artificial**

O procedimento de preparo da dieta artificial utilizada para os bioensaios e para a criação das lagartas foi adaptado de Jeschke *et al.* (2016). A dieta mínima continha uma porção de 25 g de farinha de feijão branco, 2,4 g de ágar, 0,45 g de

ácido ascórbico, 0,25 g de ácido benzóico, 0,9 mL de solução de vitaminas (Vitagold ou semelhante) e 0,2 mL de formaldeído (3,7% em água). A farinha de feijão branco, ácido ascórbico e ácido benzóico foram misturados em 25 mL de água destilada. O ágar foi adicionado em 80 mL de água destilada e aquecido (ou fervido) em micro-ondas até a dissolução completa. Após isso, o ágar completamente dissolvido (ainda fervente) foi adicionado a mistura de farinha e agitado com auxílio de um homogeneizador elétrico (mixer) até que nenhum aglomerado fosse visível. Quando a mistura estava morna (temperatura de aproximadamente 35 °C), mas ainda líquida, adicionou-se o formaldeído e a solução de vitaminas. Para as dietas de tratamento, o extrato comercial (pulverizado e suspenso em DMSO) ou as isoflavonas isoladas (dissolvidas em DMSO) também foram adicionadas nesta última etapa. As dietas controle de cada bioensaio foram acrescidas do mesmo volume de DMSO puro.

### **3.4. Bioensaios iniciais com produto comercial incorporado à dieta**

Nesta etapa utilizou-se lagartas de terceiro instar em ensaios de alimentação com dieta artificial acrescida do extrato comercial à base de soja em uma concentração de 1 comprimido (150 mg de extrato) por 50g de dieta. Lagartas de terceiro instar foram individualizadas em placa de Petri de plástico devido ao comportamento canibal. Os grupos controle e tratamento utilizaram dez larvas cada (N=10). A identificação do estágio larval foi realizada conforme descrito por Guzmán Prada *et al.* (2018).

Após a individualização dos insetos, cada indivíduo recebeu um cubo (~1,0 cm<sup>3</sup>) de dieta correspondente ao seu tratamento, o qual foi trocado a cada dois dias. O produto comercial contém 150 mg de um extrato hidroalcolico padronizado em 40% de isoflavonas totais. Para esse experimento foram usados 2 comprimidos por 100 g de dieta, resultando em uma concentração de aproximadamente 3 mg de isoflavonas por grama de dieta, o que é comparável à quantidade de isoflavonas encontrada em folhas e brotos de soja (ORHAN *et al.*,

2007; SILVA *et al.*, 2018). O produto pulverizado foi suspenso em DMSO em quantidade inferior a 5% da dieta e adicionado durante a sua preparação, conforme descrito na **subseção 3.3**. Vale ressaltar que as larvas foram alimentadas com dieta artificial sem adição dos compostos de interesse até atingirem o 3º instar. Após administração do extrato por 15 dias, amostras das fezes excretadas durante os bioensaios foram coletadas para posteriores análises cromatográficas.

### **3.5. Extração e isolamento de isoflavonas de soja**

#### **3.5.1. Procedimento de extração**

A extração das isoflavonas foi feita com o produto comercial (20 comprimidos) pulverizado em gral, usando metanol/água (9:1) como solvente extrator. Para isso, uma massa aproximada de 3,0 gramas de pó seco desse produto foi igualmente distribuída em dois tubos Falcon (50 mL) e adicionado 25 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1) em cada tubo. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada em um agitador de tubos do tipo Vórtex por 3 minutos e banho ultrassônico por 10 minutos, centrifugada a 25 °C e 5000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado e transferido para um balão de vidro. A partir da adição do solvente (MeOH/H<sub>2</sub>O, 9:1) até a coleta do sobrenadante, esse processo foi repetido mais duas vezes. Após isso, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e a amostra ressuspensa em MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1) na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup> e filtrada (filtro Nylon, 13mm x 0,22 µm).

#### **3.5.2. Purificação de isoflavonas**

Primeiramente, foi realizada uma análise cromatográfica exploratória baseada em condições predefinidas (NEGRA, 2019), visando a separação das isoflavonas. Tal procedimento foi efetuado em escala analítica no modo de eluição gradiente, no qual utilizou-se uma coluna Gemini<sup>®</sup> C18 (150 x 4.6 mm, partícula de 5 µm). Foi utilizado um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, usando água (solvente

A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel. Na **Tabela 2** é mostrado o gradiente de eluição da corrida exploratória.

**Tabela 2** - Gradiente exploratório para otimização do método de isolamento.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A% (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>B% (ACN)</b>
<b>0,010</b>	95	5,0
<b>40,00</b>	0	100
<b>45,00</b>	0	100
<b>45,01</b>	95	5,0
<b>60,00</b>	95	5,0

Após encontrar as condições adequadas para a separação dos compostos de interesse, optou-se pelo modo de eluição isocrático, o qual apresentou boa resolução e redução no tempo de análise. Por fim, esse método foi transferido para escala semipreparativa.

Para o isolamento das duas isoflavonas majoritárias (daidzeína e genisteína), alíquotas de 100 µL da amostra extraída (adquirida conforme o procedimento apresentado no subitem anterior **3.5.1**) foram injetadas no equipamento de cromatografia líquida semipreparativa (cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu<sup>®</sup>, acoplado a bombas de modelo LC-6AD com controlador de sistema CBM-20A, degaseificador DGU-20A, detectores de arranjo de diodos UV-vis SPD-M20A Shimadzu com coletor automático) e a separação dos compostos foi obtida em uma coluna Gemini<sup>®</sup> C18 (250 x 10 mm, partícula de 5 µm). O sistema cromatográfico de eluição foi realizado com fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup> em modo reverso, utilizando água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel. As proporções de solventes A:B utilizadas foram de 50:50 do início ao fim (modo isocrático) com duração total de 12 minutos. O acompanhamento cromatográfico foi feito com detector de UV em comprimento de onda de 254 nm. Após a coleta das duas frações com as substâncias separadas, foi realizada a evaporação do solvente utilizando um rotaevaporador e as

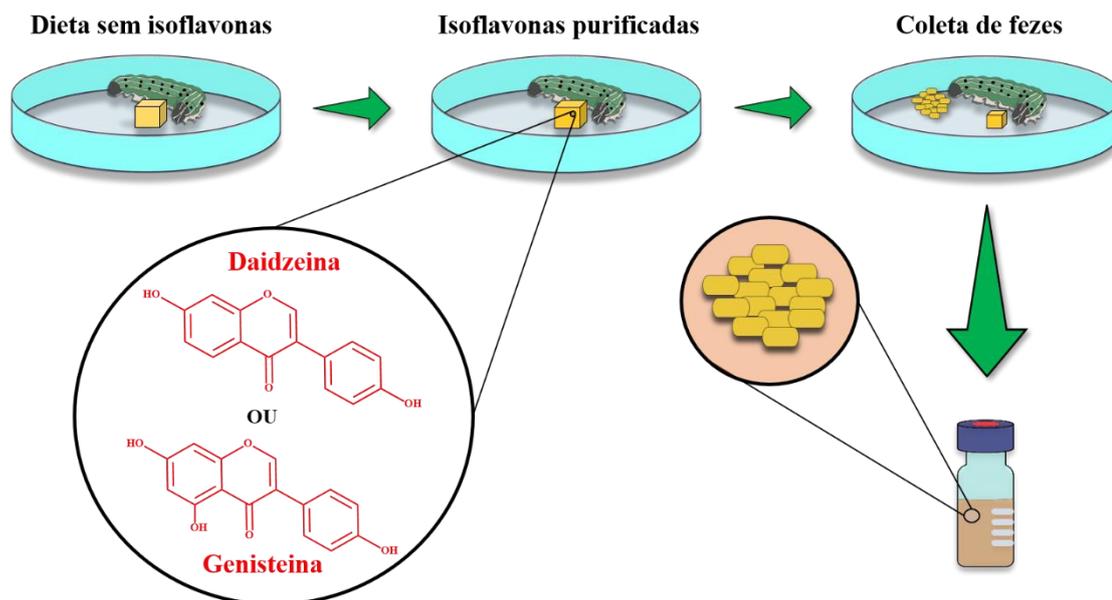
substâncias isoladas foram armazenadas em geladeira (4 °C) até análises posteriores para confirmação.

Amostras das duas isoflavonas purificadas foram preparadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich®) com concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup> para confirmação das estruturas e pureza por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, RMN <sup>1</sup>H (RMN BRUKER AVANCE DRX, com trocador automático de amostras, 400 MHz).

### **3.6. Bioensaios com as duas isoflavonas incorporadas na dieta**

Os bioensaios realizados com as isoflavonas isoladas foi semelhante ao método descrito na **subseção 3.4** para o produto comercial. Foram utilizadas lagartas de terceiro instar em ensaios de alimentação, na qual dietas artificiais acrescidas das duas isoflavonas isoladas (daidzeína e genisteína) foram preparadas. Para cada tratamento utilizou-se dez larvas (N=10), isto é, tratamento com daidzeína (10 lagartas), genisteína (10 lagartas) e dieta controle (10 lagartas), totalizando 30 larvas utilizadas.

Após a individualização dos insetos em placa de Petri, cada indivíduo recebeu um cubo (~1,0 cm<sup>3</sup>) de dieta correspondente ao seu tratamento, o qual foi trocado a cada dois dias. As isoflavonas foram incorporadas separadamente na dieta artificial em uma concentração equivalente a 1,0 µmol.g<sup>-1</sup> de dieta, tomando como base a quantidade encontrada em folhas e brotos de soja (ORHAN *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2018). Todos os compostos foram solubilizados em DMSO em quantidades inferiores a 5% da dieta e adicionados durante a sua preparação, conforme descrito na **subseção 3.3**. Após administração por 10 dias, amostras das fezes excretadas durante os bioensaios foram coletadas para posterior análises cromatográficas. O procedimento geral é mostrado na **Figura 5** em um esquema resumido dos bioensaios com dieta artificial, sem e com adição das duas isoflavonas.



**Figura 5** - Representação esquemática dos bioensaios com larvas de *S. frugiperda* de instares iniciais (dieta sem isoflavonas) e 3<sup>o</sup> instar (dieta com isoflavonas).

### 3.7. Extração das fezes e análises por LC-MS

#### 3.7.1. Procedimento de extração

Os extratos de fezes excretadas durante os bioensaios foram preparados com 50 mg de fezes secas. A essa quantidade, foi adicionado 1 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1) em microtubos de 2 mL do tipo eppendorf. A amostra foi homogeneizada com agitador de tubos do tipo Vórtex por 5 minutos e centrifugada a 25 °C e 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro de nylon, e uma alíquota de 100 µL do extrato de cada amostra foi transferida para vials (2 mL) e diluído com 900 µL de metanol grau HPLC (CHROMASOLV™). Paralelamente, realizou-se a extração do produto comercial pulverizado (comprimido) seguindo o mesmo processo de extração das fezes.

### 3.7.2. Análises cromatográficas e espectrométricas

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. As condições cromatográficas e espectrométricas foram otimizadas baseando-se em parâmetros já utilizados em trabalhos desenvolvidos anteriormente no grupo de pesquisa com flavonoides (NEGRA, 2019; COSTA, 2021).

#### 3.7.2.1. Análise dos bioensaios iniciais

Para as análises dos bioensaios iniciais foi utilizado um instrumento Agilent 6545 (QToF) acoplado a um sistema UPLC Agilent 1260 Infinity II. No qual, utilizou-se um sistema binário de bombas com um volume de 1  $\mu$ L por injeção e uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm, partícula de 1,8  $\mu$ m) mantida em temperatura de 35 °C. O sistema cromatográfico de eluição foi realizado com fluxo de 0,4 mL/min em modo reverso, utilizando água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. Na **Tabela 3** é mostrado o gradiente de eluição utilizado.

**Tabela 3** - Gradiente para análise do metabolismo de isoflavonas por LC-MS.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A% (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>B% (ACN)</b>
<b>0,01</b>	90	10
<b>5,00</b>	80	20
<b>9,00</b>	60	40
<b>9,10</b>	0	100
<b>12,00</b>	0	100
<b>12,10</b>	90	10
<b>15,00</b>	90	10

As condições utilizadas no espectrômetro de massas foram as seguintes: Ionização por Eletrospray (IES) em modo positivo com varredura de massas na faixa de 100 a 1000  $m/z$ , temperatura do gás de secagem à 325 °C, taxa de fluxo

de gás de secagem à 12 L.min<sup>-1</sup>, pressão do gás nebulizador de 25 psi, energia de colisão de 15 eV, potencial capilar de 3500 V, potencial fragmentador de 150 V, voltagem da fonte de íons de 1000 V. Os dados foram adquiridos com o software Mass Hunter Acquisition B.08.00 e analisados por meio do software Mass Hunter Qualitative, versão B.08.00 (Agilent Technologies, CA, EUA).

### 3.7.2.2. *Análise dos bioensaios com as isoflavonas isoladas*

Para as análises dos bioensaios com as isoflavonas isoladas, foi utilizado UPLC Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A – *High speed Pump*), auto-injetor, compartimento de colunas (G7129B – *1290 Vialsampler*) e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G7114B – modelo 1260 *Infinity II* – VWD), o qual encontra-se acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF (Bruker Daltonics - Impact, Rheinstetten, Alemanha).

As análises foram realizadas utilizando um volume de 2 µL por injeção da amostra e uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm, partícula de 1,8 µm) mantida em temperatura de 35 °C. O sistema cromatográfico de eluição foi realizado com fluxo de 0,4 mL/min em modo reverso, utilizando água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi semelhante ao utilizado para os bioensaios iniciais (**Tabela 3**).

As condições utilizadas no espectrômetro de massas foram as seguintes: Ionização por Eletrospray (IES) em modo positivo com varredura de massas na faixa de 50 a 1300 *m/z*, temperatura do gás de secagem à 180 °C, taxa de fluxo de gás de secagem à 8,0 L.min<sup>-1</sup>, pressão do gás nebulizador de 4,0 bar, energia de colisão de 5 eV, tensão do *End Plate* de 450 V e potencial capilar de 3600 V. A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis® (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

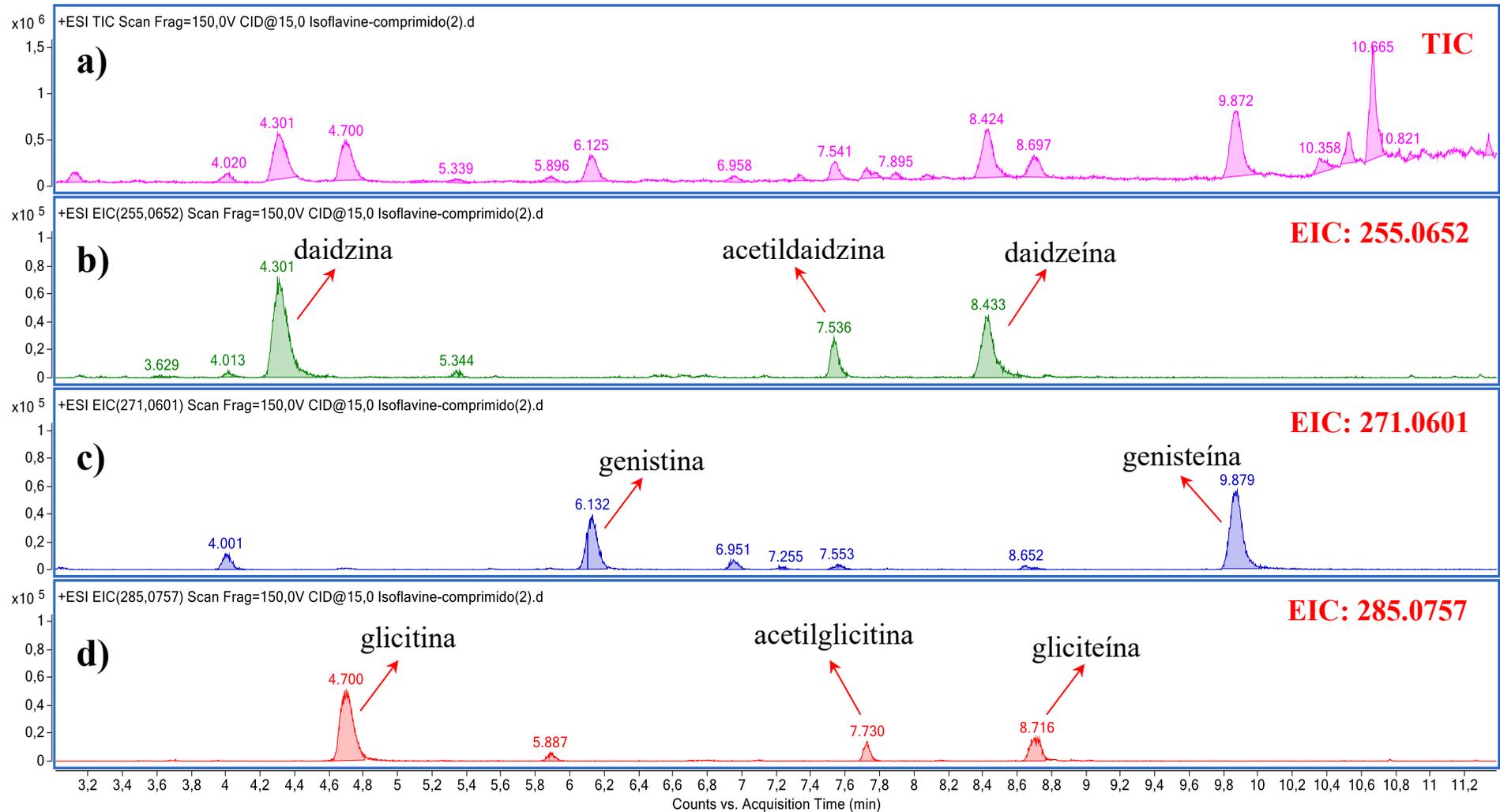
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Bioensaios iniciais

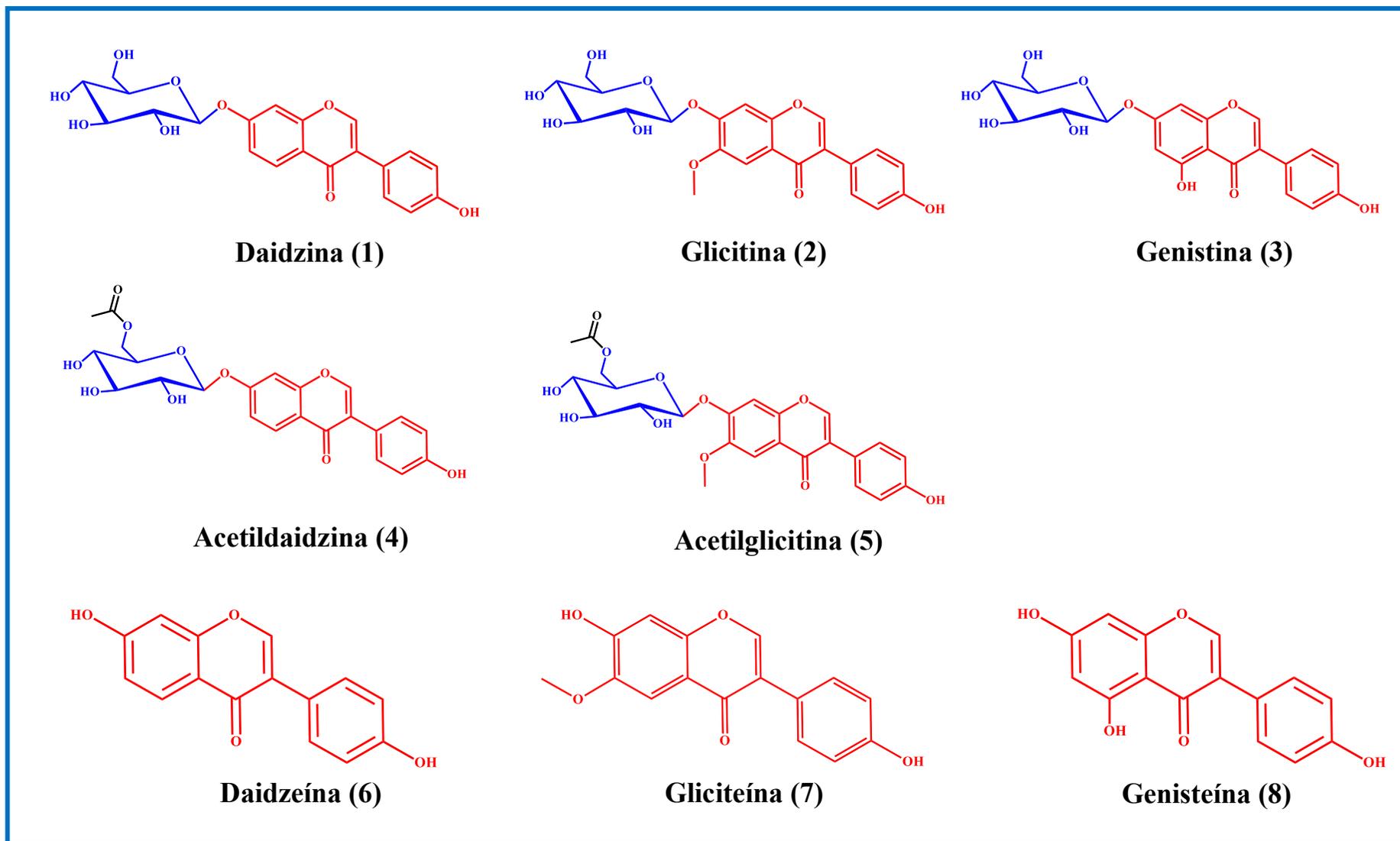
O primeiro procedimento experimental com as lagartas de *S. frugiperda* objetivou analisar, a capacidade desses insetos metabolizarem os flavonoides presentes no produto comercial à base de soja. Os extratos das fezes de lagartas que foram alimentadas com dieta artificial controle e contendo o extrato do produto comercial, bem como amostras do extrato comercial puro, foram analisados por LC-MS conforme o método descrito na **subseção 3.6.2**, a fim de compará-los para definir as próximas etapas do bioensaio.

A identificação das isoflavonas foi realizada com base nas razões  $m/z$  dos íons protonados  $[M+H]^+$  para as agliconas, e íons com aduto de sódio  $[M+Na]^+$  para os glicosídeos, onde M representa a massa molecular do composto. Para os glicosídeos de isoflavonas, as frações aglicona também são detectadas como fragmentos intensos nas condições empregadas, as quais foram utilizadas também como sinais diagnósticos de conjugados de isoflavonas. É importante frisar que a identificação desses compostos baseada nas massas exatas e nos padrões de fragmentação, só foi possível devido a vasta literatura disponível sobre a identificação desses metabólitos (WANG e SPORNS, 2000; GENOVESE *et al.*, 2003; VACEK *et al.*, 2008; CUNHA, 2013; NAKATA *et al.*, 2018; JUNG *et al.*, 2020).

No extrato do produto comercial, as principais isoflavonas da soja e suas formas glicosídicas foram detectadas. A **Figura 6** apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) e os cromatogramas de íons extraídos (EIC) para a daidzeína ( $m/z$  255.0652), genisteína ( $m/z$  271.0601) e gliciteína ( $m/z$  285.0757) do extrato do produto comercial. Os EICs para cada isoflavona identificada foram obtidos a partir das massas exatas das agliconas protonadas, como destacadas em vermelho em cada cromatograma. As estruturas e informações de cada molécula detectada estão apresentadas na **Figura 7** e **Tabela 4**, respectivamente.



**Figura 6** - Cromatogramas das isoflavonas encontradas no extrato do produto comercial à base de soja. **a)** TIC do extrato do produto comercial; **b)** EIC para daidzeína; **c)** EIC para genisteína; **d)** EIC para gliciteína.



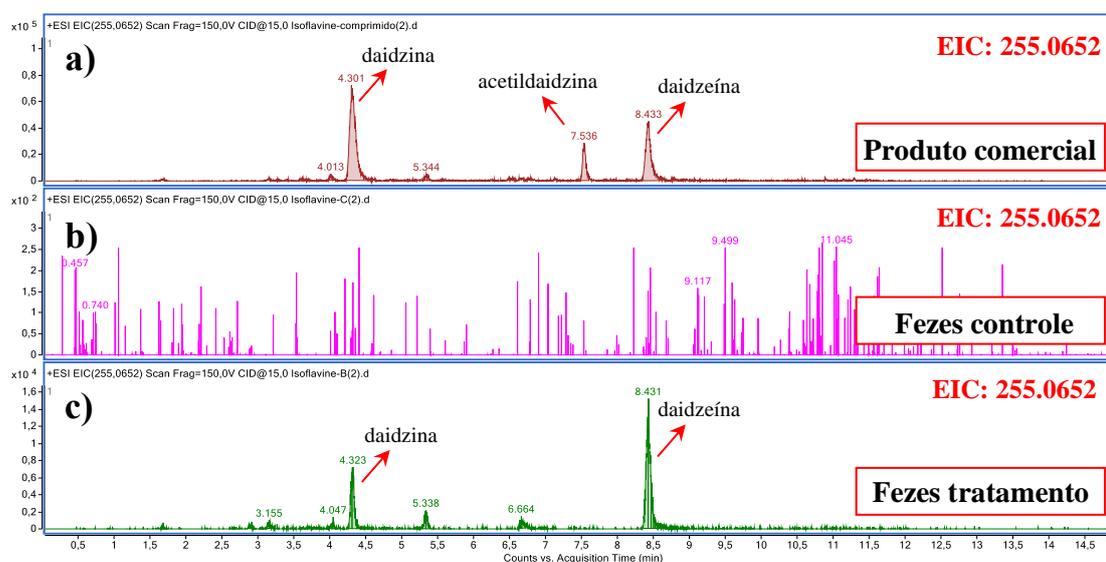
**Figura 7** - Estruturas das isoflavonas de soja encontradas no produto comercial.

**Tabela 4** - Perfil químico de isoflavonas no extrato do produto comercial.

Composto	Fórmula	Espécie iônica	Teórica (m/z)*	Experimental (m/z)	Erro (ppm)
<b>Daidzina (1)</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	439,1000	439,1013	2,96
<b>Glicitina (2)</b>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	469,1105	469,1101	-0,85
<b>Genistina (3)</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	455,0949	455,0950	0,22
<b>Acetildaidzina (4)</b>	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	481,1105	481,1115	2,07
<b>Acetilglicitina (5)</b>	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	511,1211	511,1210	-0,19
<b>Daizeína (6)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	255,0652	255,0656	1,57
<b>Gliciteína (7)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	285,0757	285,0755	-0,71
<b>Genisteína (8)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	271,0601	271,0601	0

\*As massas teóricas utilizadas para o cálculo do erro de massa em (ppm) foram obtidas no software de tratamentos de dados do equipamento, Mass Hunter Qualitative® (Agilent).

Os cromatogramas dos extratos das fezes das lagartas que se alimentaram apenas com a dieta artificial (controle) e com dieta modificada (produto comercial) foram comparados com os cromatogramas do extrato puro para cada isoflavona através do seu EIC correspondente, como observado na **Figura 8** para a daidzeína e derivados.



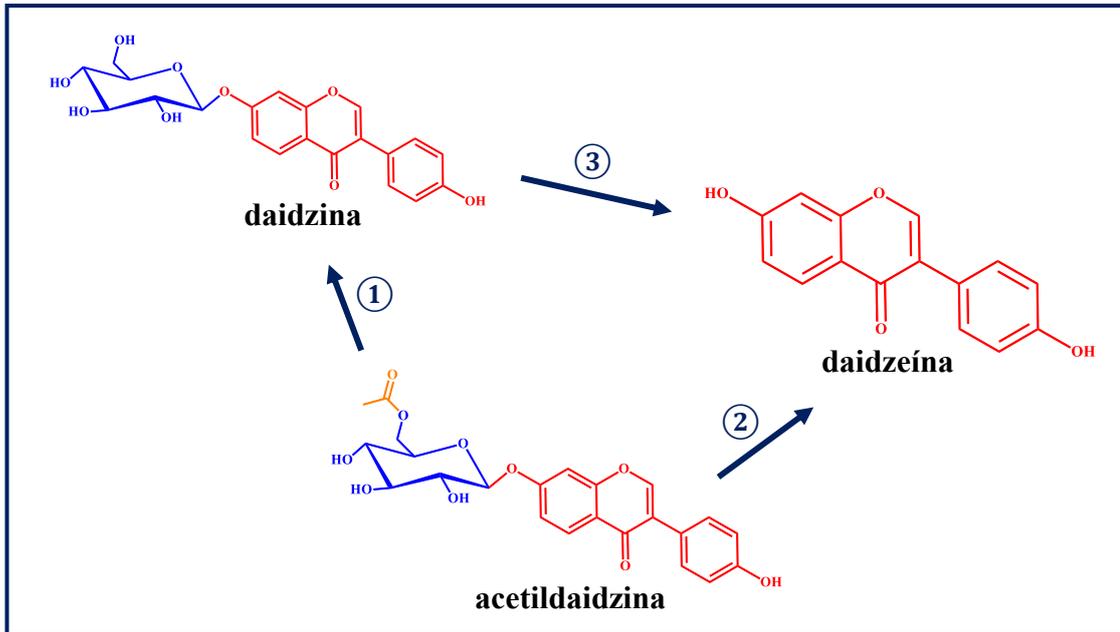
**Figura 8** - Comparação dos cromatogramas de íons extraídos da daidzeína e derivados. **a)** Extrato produto comercial, **b)** Extrato das fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta controle e **c)** Extrato das fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta modificada com o produto comercial.

Ao comparar os cromatogramas 8a) e 8b) com 8c), observa-se que as fezes do grupo tratado apresentam dois sinais em comum com o extrato comercial, identificados como daidzeína (8,4 min) e o seu glicosídeo, daidzina (4,3 min). Nas fezes do grupo controle não foram observados sinais correspondentes à daidzeína ou seus derivados.

Além disso, o extrato comercial apresentou um sinal no tempo de retenção próximo de 7,5 minutos, que foi atribuído a um derivado acetildaidzina. Esse sinal não foi observado nas fezes do grupo tratado, podendo ser hipotetizado uma possível metabolização e/ou absorção desse composto pelo inseto, ou até mesmo ter degradado devido a sua labilidade.

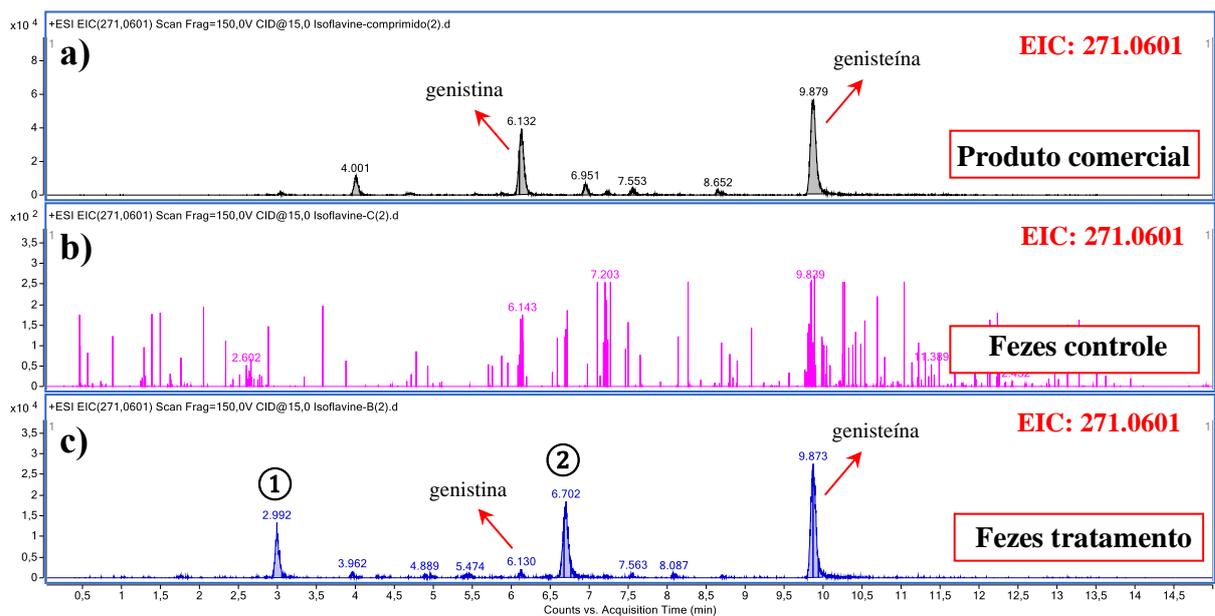
Outro perfil observado foi a diferença na intensidade dos sinais de daidzina e daidzeína no extrato puro comparado com as fezes do grupo tratado. Enquanto no extrato comercial o sinal da daidzina apresentou uma intensidade maior que o da daidzeína, nas fezes do grupo tratado essa relação foi inversa. Possivelmente, as lagartas metabolizaram e/ou absorveram parcialmente o composto daidzina, resultando na variação de intensidade dos sinais desses compostos.

O esquema abaixo (**Figura 9**) exemplifica de forma hipotética as possíveis rotas metabólicas, para mostrar o que poderia ter provocado uma maior intensidade da daidzeína após a ingestão pelo inseto. É sugerida uma possível rota<sup>①</sup> teórica que leva a acetildaidzina perder o grupo acetil resultando em daidzina e outra rota<sup>②</sup> que envolve uma perda do grupo acetilglicosil, resultando diretamente em daidzeína. Além disso, em uma terceira rota<sup>③</sup>, a daidzina poderia ser biotransformada em daidzeína com a perda do grupo glicosil.



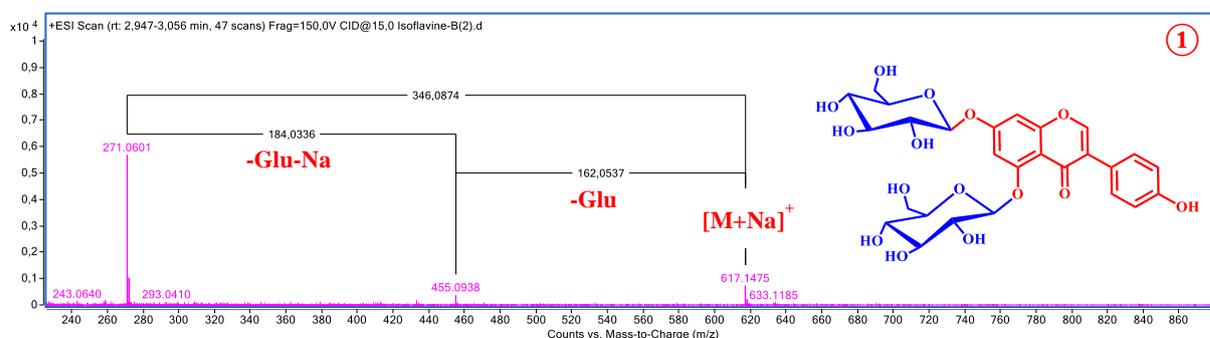
**Figura 9** - Esquema de biotransformação sugerido para a isoflavona daidzeína.

Os cromatogramas de íons extraídos correspondentes a isoflavona genisteína e seus derivados também foram comparados a fim de identificar diferenças qualitativas nos sinais, como visto na **Figura 10**.



**Figura 10** - Comparação dos cromatogramas de íons extraídos da genisteína e derivados. **a)** Extrato produto comercial, **b)** Extrato das fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta controle e **c)** Extrato das fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta modificada com o produto comercial.

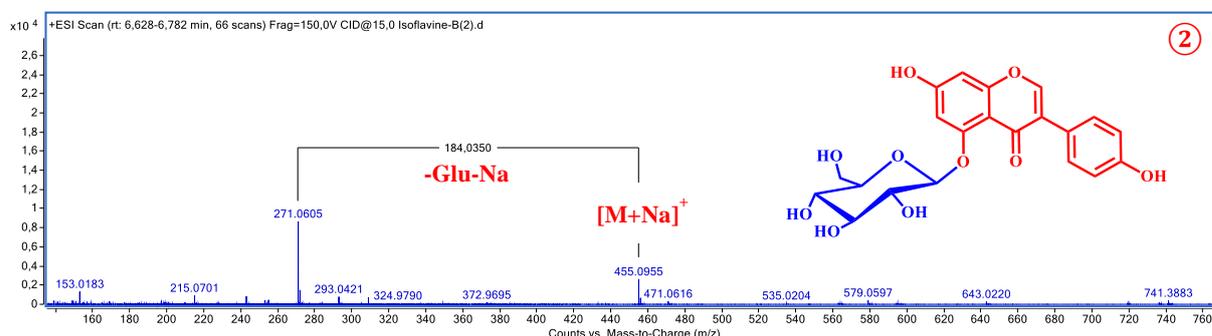
Na **Figura 10**, o cromatograma do produto comercial (10a) tem-se dois respectivos sinais em aproximadamente 6,1 e 10 minutos que são característicos da genistina ( $m/z$  455.0950) e genisteína ( $m/z$  271.0601), tais sinais também foram identificados no cromatograma do grupo tratado (10c) com perfis semelhantes àqueles da 10a) em relação ao tempo de retenção. Além disso, tem-se no cromatograma do grupo tratado, dois sinais de possíveis novos compostos que foram obtidos no extrato das fezes que não foram detectados no extrato do produto comercial e, tampouco no extrato das fezes do grupo controle (10b). Tal informação indica que a *S. frugiperda* metabolizou esta isoflavona seguindo outras vias metabólicas distintas comparado ao que foi observado em daidzeína. Quanto aos sinais da genistina identificados no extrato das fezes do grupo tratado, foi possível perceber que o sinal próximo de 6,1 minutos apresentou uma intensidade menor comparado ao mesmo sinal no cromatograma do produto comercial, em 10a), que pode ser sugerido à metabolização e/ou absorção da genistina. Em relação aos novos sinais, tal processo pode ter ocasionado em uma glicosilação da genistina ou uma di-glicosilação da genisteína, no qual o primeiro sinal detectado no extrato das fezes em aproximadamente 3,0 minutos, apresentou  $m/z$  617.1475 equivalente a um composto derivado de genisteína com dois glicosídeos, conforme a estrutura sugerida na **Figura 11**.



**Figura 11** - Espectrograma de massas do composto 1 derivado da genisteína encontrado nas fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial contendo o produto comercial.

Ainda sobre o extrato das fezes, o segundo sinal detectado em aproximadamente 6,7 minutos, apresentou  $m/z$  455.0955. Conforme mostrado na

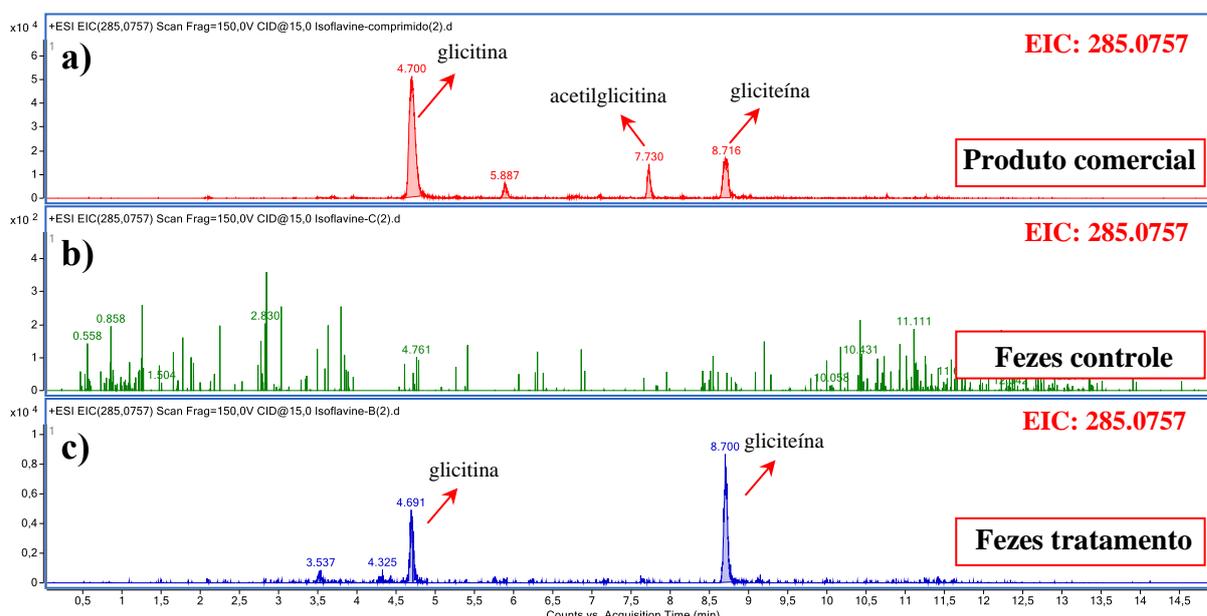
**Figura 12**, é possível observar a perda de um glicosídeo tal como foi observado para o composto 1. Entretanto, apenas com esses resultados preliminares de extrato bruto, não é possível afirmar com precisão se o processo envolvido na metabolização desses compostos pela lagarta foi realmente tal como descrito.



**Figura 12** - Espectrograma de massas do composto 2 derivado da genisteína encontrado nas fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial contendo o produto comercial.

Nesse contexto, para os dois compostos foram sugeridas as duas possíveis estruturas baseadas nos valores de  $m/z$  e no que é esperado do metabolismo dessa classe de compostos por insetos (SALMINEN *et al.*, 2004; HIRAYAMA *et al.*, 2008; DAIMON *et al.*, 2010; NEGRA, 2019). Entretanto, as posições de substituições sugeridas nas **Figuras 11** e **12** para esses dois metabólitos, não refletem a verdadeira posição do(s) glicosídeo(s), pois os dados obtidos nesse trabalho são insuficientes para afirmar com exatidão sobre a real posição dessas substituições.

Além disso, também foram obtidos os cromatogramas de íons extraídos para a isoflavona gliciteína e comparados entre os três extratos mencionados anteriormente, conforme a **Figura 13**. De acordo com os sinais cromatográficos foi possível observar que a gliciteína apresentou comportamento semelhante ao visualizado para a daidzeína, assim, até então, o que foi sugerido como hipóteses para daidzeína também se aplica para gliciteína.



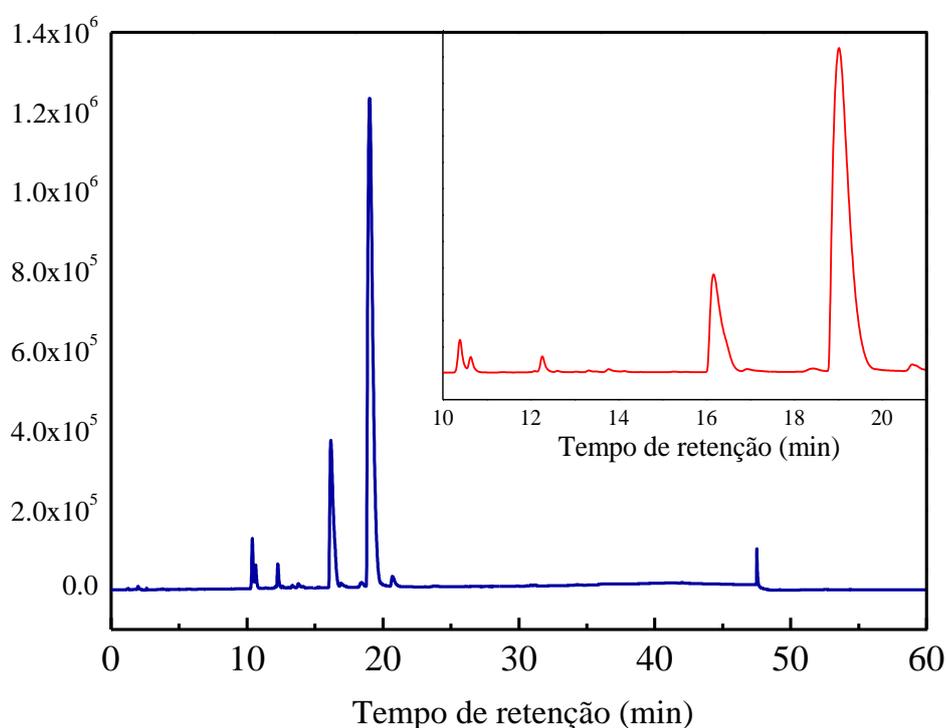
**Figura 13** - Comparação dos cromatogramas de íons extraídos da gliciteína e derivados. **a)** Extrato produto comercial, **b)** Extrato das fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta controle e **c)** Extrato das fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta modificada com o produto comercial.

Por fim, vale ressaltar que todos os dados apresentados nesta seção, foram obtidos a partir dos bioensaios realizados com dieta artificial acrescida de uma mistura de isoflavonas totais (produto comercial). Tendo em vista que os resultados mostrados possibilitam hipotetizar que as lagartas conseguem metabolizar e/ou absorver essa subclasse de compostos, decidiu-se isolar as duas principais agliconas: genisteína e daidzeína, para verificar de forma separada as possíveis biotransformações observadas através de bioensaios com as lagartas alimentadas da dieta acrescida com essas duas isoflavonas.

## 4.2. Isolamento e caracterização das Isoflavonas

Inicialmente, foi realizada uma corrida exploratória cromatográfica na escala analítica para verificar as melhores condições de separação dos analitos, extraídos com metanol/água (9:1 v/v), visando efetivar o isolamento posterior das isoflavonas alvo. A resposta mostrada na **Figura 14** (*insert* de 10 - 21 minutos) sugere que os cinco sinais que foram identificados ao longo da janela de tempo limitada (0 - 60 minutos), podem ser majoritariamente das isoflavonas de

interesse. Isso é esperado, pois de acordo com a descrição do produto comercial, há 40,0 % de isoflavonas totais. Além disso, a presença desses compostos foi observada nos cromatogramas do extrato do produto comercial, conforme apresentado anteriormente na **Figura 6**.

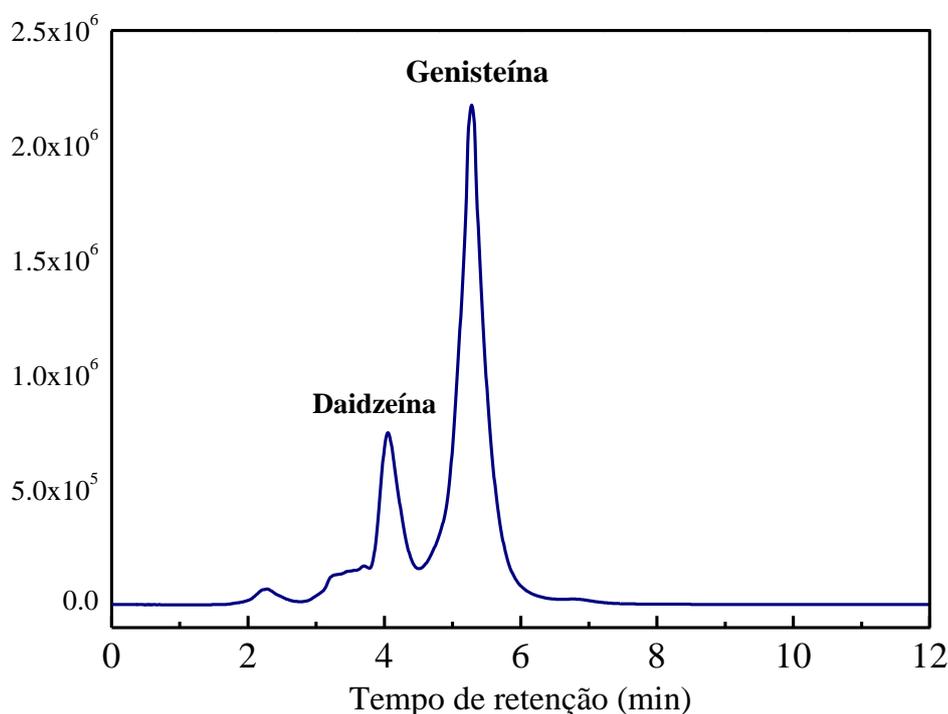


**Figura 14** – Cromatograma analítico dos compostos separados do extrato do produto comercial à base de soja.

No trabalho desenvolvido por Genovese *et al.*, (2003) que avaliaram o teor e perfil de isoflavonas em diferentes produtos comercializados, dentre eles a Isoflavine (o mesmo produto comercial usado neste estudo), foram encontrados aproximadamente 29,7 % de daidzeína total, 64,6 % de genisteína total e 5,7 % de gliciteína total nesse extrato comercial. Além dos comportamentos já observados neste trabalho sobre a ordem de eluição das duas isoflavonas, os sinais de maiores intensidades detectados nos tempos de retenção próximos de 16 e 19 minutos foram atribuídos à daidzeína e genisteína, respectivamente.

Foi realizado o isolamento dos dois compostos de maiores intensidades no modo isocrático na escala semipreparativa, adquirindo-se uma quantidade de

aproximadamente 6,0 mg de daidzeína e 21,0 mg de genisteína, a **Figura 15** mostra os sinais do cromatograma de isolamento desses compostos, o qual foi obtido a partir da análise na escala semipreparativa.



**Figura 15** – Cromatograma semipreparativo de isolamento das duas principais isoflavonas da soja.

Posterior ao isolamento, as duas frações isoladas foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H a fim de confirmar suas estruturas e pureza, bem como por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta/visível para conferir os comprimentos de onda que essas moléculas absorvem e comparar com dados na literatura.

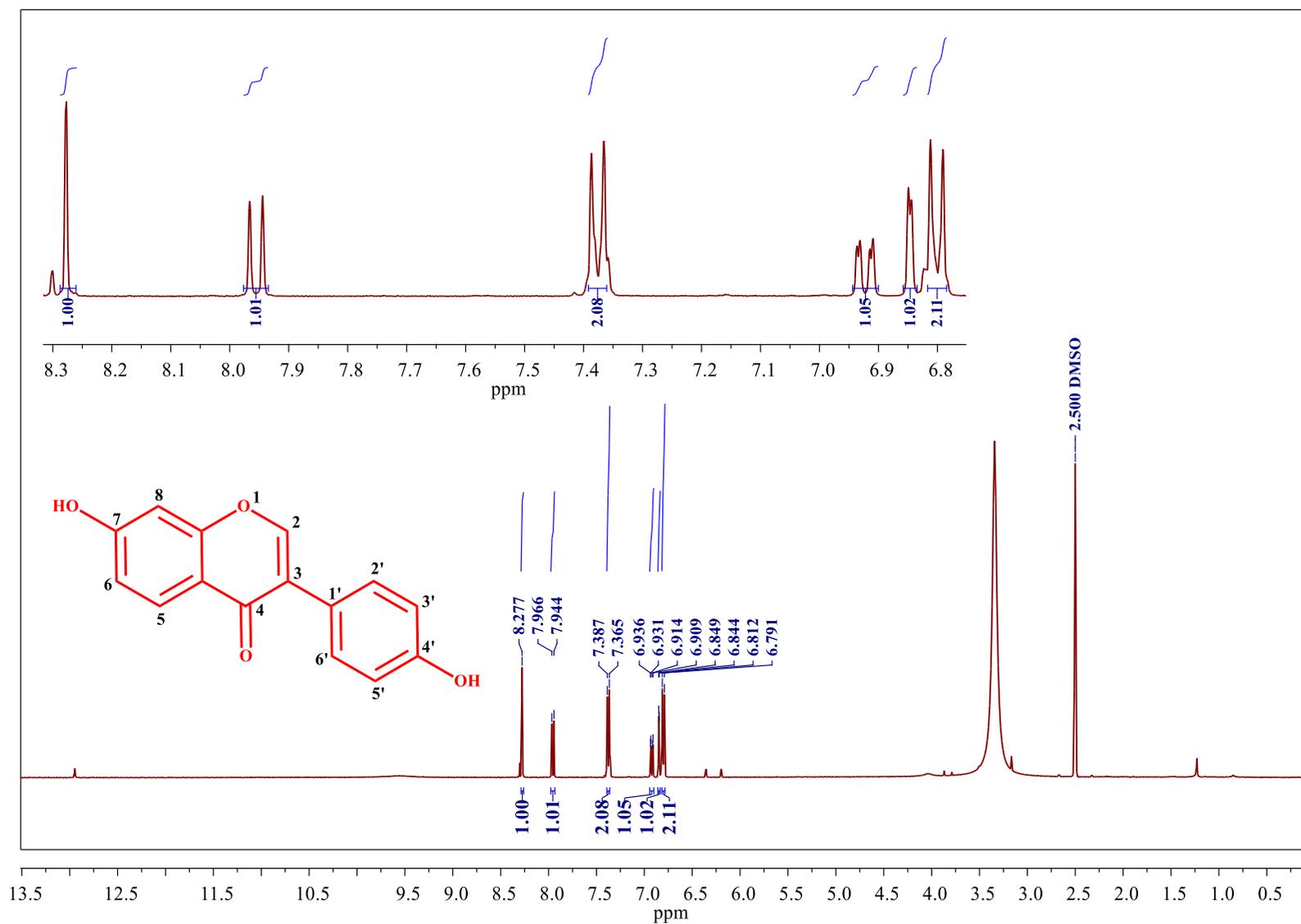
#### **4.2.1. Caracterização da daidzeína e genisteína**

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da daidzeína, mostrado na **Figura 16**, apresentou sinais que caracterizam a classe estrutural dos flavonoides, no qual foi observado cinco sinais característicos de hidrogênios aromáticos. Esse espectro exibiu três dubletos em  $\delta$  6.80 ( $J = 8.4$  Hz) referente ao H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>,  $\delta$  7.38 ( $J = 8.4$  Hz) referente

ao H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>, ambos pertencentes ao anel B do flavonoide, e  $\delta$  7.96 ( $J = 8.8$  Hz) referente ao H<sub>5</sub> do anel A. Ainda, um dubleto em  $\delta$  6.85 ( $J = 1.9$  Hz) referente ao H<sub>8</sub> e um duplo-dubleto em  $\delta$  6.92 ( $J = 8.8$  e 1.9 Hz) referente ao H<sub>6</sub>, ambos acoplados em meta e pertencentes ao anel A. Além disso, foi possível verificar a presença de um singleto em  $\delta$  8.28 que foi atribuído ao H<sub>2</sub> do anel C. A **Tabela 5** mostra os dados de RMN <sup>1</sup>H para a molécula daidzeína, comparados a dados encontrados na literatura.

**Tabela 5** - Dados de deslocamento de RMN <sup>1</sup>H da substância daidzeína (400 MHz, DMSO-d<sup>6</sup>), comparados a dados encontrados na literatura (SUNG *et al.*, 2004).

Posição	Daidzeína	
	$\delta_H$ (J)	$\delta_H$ (J) <sub>Literatura</sub>
2	8.28, <i>s</i>	8.29, <i>s</i>
5	7.96, <i>d</i> (8.8)	7.97, <i>d</i> (8.7)
6	6.92, <i>dd</i> (8.8, 1.9)	6.94, <i>dd</i> (8.9, 2.1)
8	6.85, <i>d</i> (1.9)	6.86, <i>m</i> (2.0)
2'	7.38, <i>d</i> (8.4)	7.39, <i>d</i> (8.5)
3'	6.80, <i>d</i> (8.4)	6.81, <i>d</i> (8.5)
5'	6.80, <i>d</i> (8.4)	6.81, <i>d</i> (8.5)
6'	7.38, <i>d</i> (8.4)	7.39, <i>d</i> (8.5)
7-OH	-	10.76, <i>s</i>
4'-OH	-	9.52, <i>s</i>

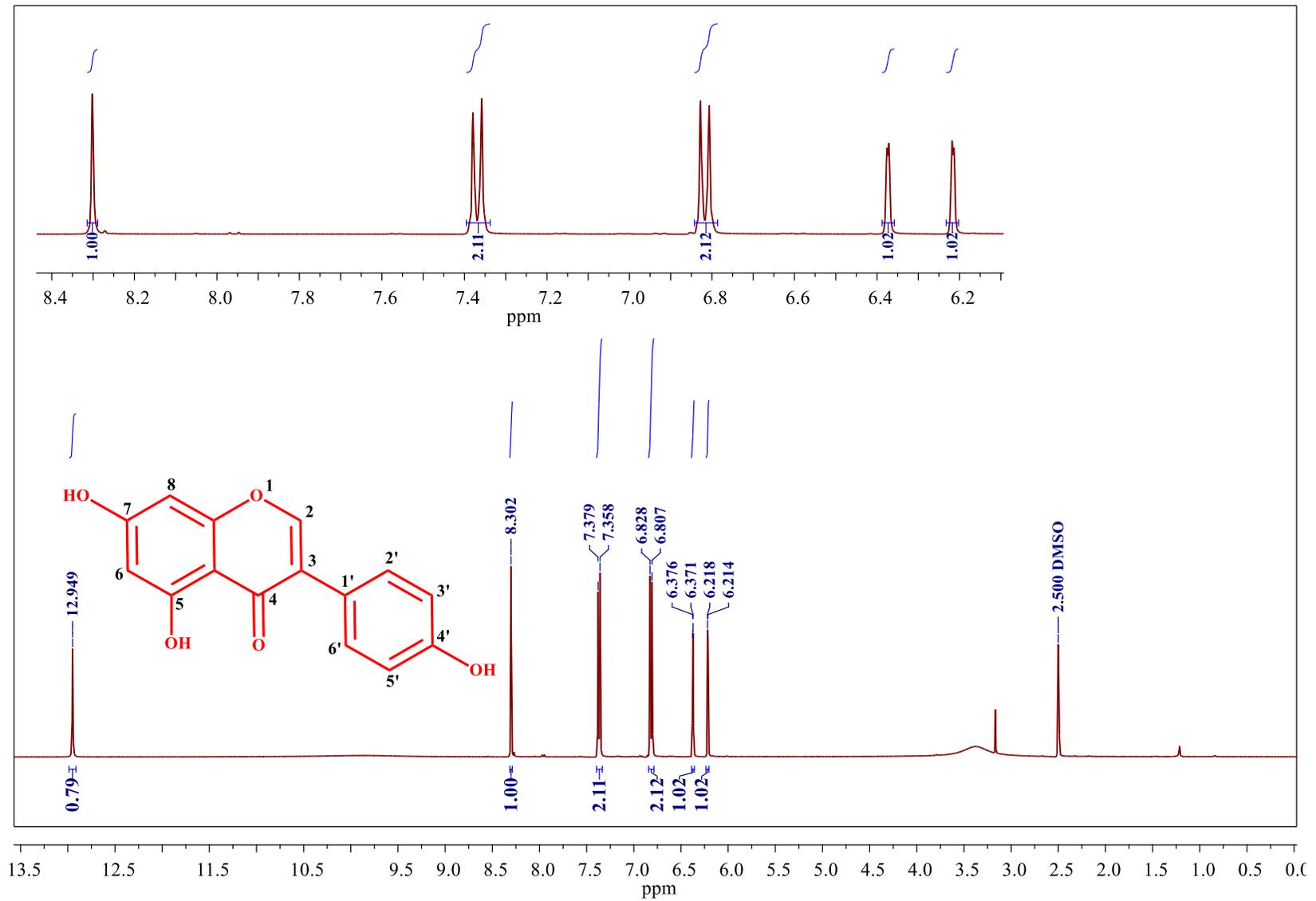


**Figura 16** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e estrutura da substância daidzeína (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da genisteína, mostrado na **Figura 17**, também apresentou sinais que caracterizam a classe estrutural dos flavonoides, no qual foi observado quatro sinais característicos de hidrogênios aromáticos. Esse espectro exibiu dois dubletos em  $\delta$  6.82 ( $J = 8.5$  Hz) referente ao  $\text{H}_{3'}$  e  $\text{H}_{5'}$ , e  $\delta$  7.37 ( $J = 8.5$  Hz) referente ao  $\text{H}_{2'}$  e  $\text{H}_{6'}$ , ambos pertencentes ao anel B do flavonoide. Ainda, dois dubletos em  $\delta$  6.22 ( $J = 1.7$  Hz) referente ao  $\text{H}_6$  e em  $\delta$  6.37 ( $J = 1.7$  Hz) referente ao  $\text{H}_8$ , ambos acoplados em meta e pertencentes ao anel A. Assim como observado no espectro da daidzeína, também foi possível verificar a presença de um singlete em  $\delta$  8.28 que foi atribuído ao  $\text{H}_2$  do anel C, além de um sinal em  $\delta$  12.95 característico de hidroxila na posição  $\text{C}_5$  quelada com a carbonila  $\text{C}_4$  de flavonoides. A **Tabela 6** mostra os dados de RMN  $^1\text{H}$  para a molécula genisteína, comparados a dados encontrados na literatura.

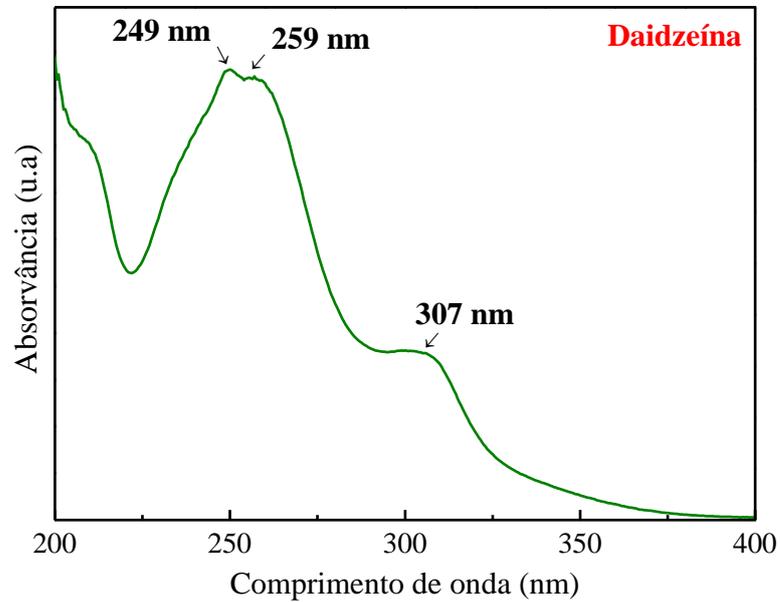
**Tabela 6** - Dados de deslocamento de RMN  $^1\text{H}$  da substância Genisteína (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ), comparados a dados encontrados na literatura (SUNG *et al.*, 2004).

Posição	Genisteína	
	$\delta_{\text{H}} (J)$	$\delta_{\text{H}} (J)_{\text{Literatura}}$
2	8.30, <i>s</i>	8.29, <i>s</i>
6	6.22, <i>d</i> (1.7)	6.21, <i>m</i> (2.0)
8	6.37, <i>d</i> (1.7)	6.37, <i>m</i> (2.0)
2'	7.37, <i>d</i> (8.5)	7.36, <i>d</i> (8.3)
3'	6.82, <i>d</i> (8.5)	6.81, <i>d</i> (8.3)
5'	6.82, <i>d</i> (8.5)	6.81, <i>d</i> (8.3)
6'	7.37, <i>d</i> (8.5)	7.36, <i>d</i> (8.3)
5-OH	12.95, <i>s</i>	12.95, <i>s</i>
7-OH	-	10.86, <i>s</i>
4'-OH	-	9.58, <i>s</i>

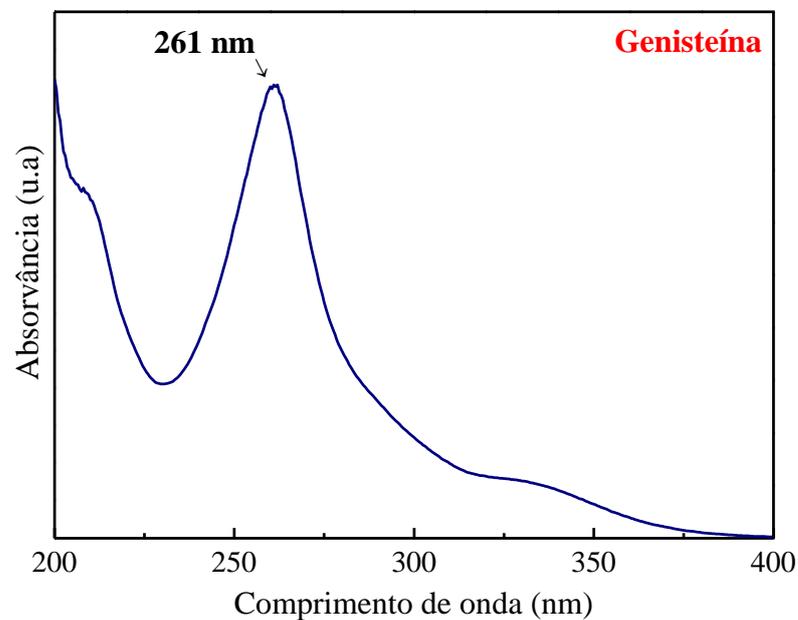


**Figura 17** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e estrutura da substância genisteína (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Os dados espectrais de UV/Vis, mostram que as duas isoflavonas isoladas, daidzeína e genisteína, apresentam sinais de absorção na região do ultravioleta. Para daidzeína, foi observado absorção máxima em comprimento de onda de 249 nm (**Figura 18**) e para genisteína, a absorção máxima foi em 261 nm (**Figura 19**).



**Figura 18** - Espectro de ultravioleta da daidzeína.



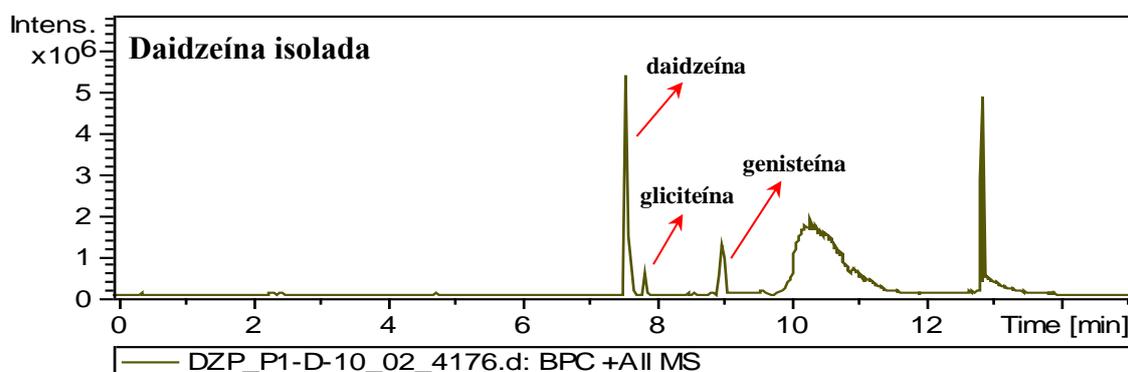
**Figura 19** - Espectro de ultravioleta da genisteína.

Na literatura, os comprimentos de onda com absorção máxima correspondentes a daidzeína, são observados em 246.9 nm e 247.5 nm. Já para genisteína, as absorções máximas ocorrem em 258.8 nm e 260.5 nm (CUNHA, 2013; JUNG *et al.*, 2020). É importante ressaltar que as isoflavonas glicosiladas na posição 7, não apresentam diferenças significativas com suas respectivas agliconas. Por isso, não é possível diferir essas moléculas de seus glicosídeos com base em apenas dados UV. Entretanto, com o que já é conhecido da literatura sobre o isolamento desses compostos (GENOVESE *et al.*, 2003; SUNG *et al.*, 2004; CUNHA, 2013; JUNG *et al.*, 2020) e com os dados de RMN  $^1\text{H}$  adquiridos neste trabalho, são informações suficientes para a confirmação estrutural.

### 4.3. Bioensaios com as isoflavonas isoladas

#### 4.3.1. Análise dos metabólitos encontrados nas fezes das lagartas alimentadas com daidzeína

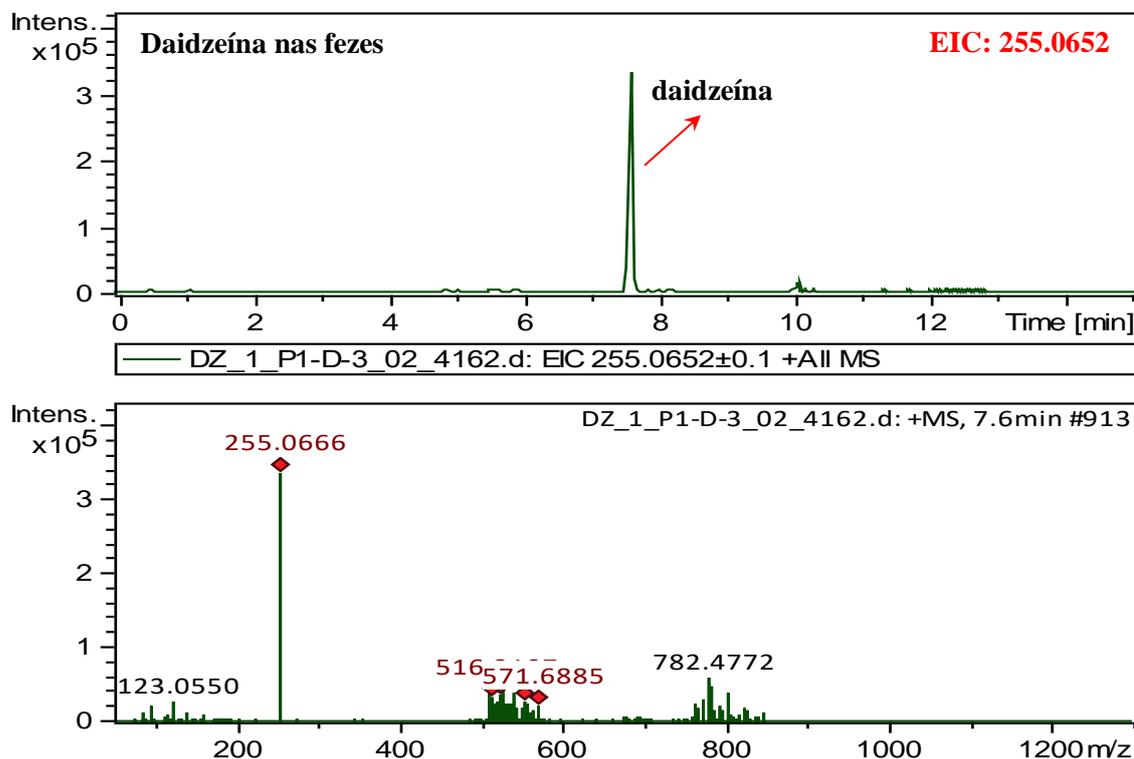
Inicialmente, analisou-se o Cromatograma de Pico Base (BPC) da daidzeína isolada, conforme apresentado na **Figura 20**. Com isso, observou-se que a amostra da isoflavona daidzeína purificada continha traços de gliciteína e genisteína. Porém, essa contaminação não foi relevante a ponto de comprometer os resultados dos bioensaios.



**Figura 20** - Cromatograma da isoflavona daidzeína isolada.

A partir da análise do EIC do extrato das fezes das lagartas submetidas ao bioensaio com daidzeína, não foi observado nenhum sinal característico da

presença de um novo composto derivado dessa isoflavona. Na **Figura 21**, é mostrado o cromatograma de íons extraídos, obtido através da massa exata da aglicona protonada ( $m/z$  255.0652), e o respectivo espectrograma de massas.



**Figura 21** - EIC e espectro de massas da daidzeína nas fezes de *S. frugiperda*.

Além disso, foi realizada uma busca pelos sinais  $m/z$  417.1180  $[M+H]^+$  e  $m/z$  439.1000  $[M+Na]^+$ , referentes ao composto daidzina (daidzeína glicosilada), mas não foi detectado nenhum sinal correspondente a essas massas exatas.

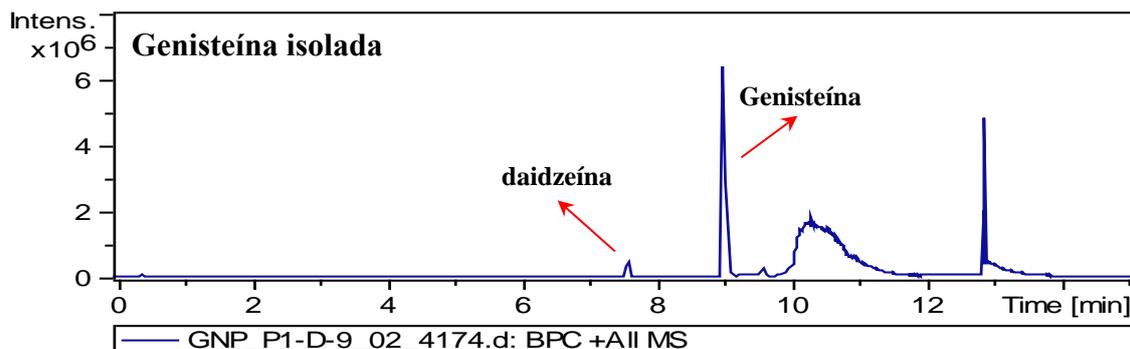
Diante do observado, pode ser sugerido que a *S. frugiperda* não é capaz de metabolizar a aglicona daidzeína por glicosilação. Entretanto, com base nos resultados dos bioensaios iniciais descritos na **subseção 4.1** e nos relatos da literatura sobre as espécies do gênero *Spodoptera* na metabolização de flavonoides, presume-se que as lagartas dessa espécie conseguem hidrolisar a daidzina ingerida, transformando-a na aglicona daidzeína, ou ainda sequestrar e/ou absorver esse composto (UEDA, 2015).

No estudo de Zhou *et al.* (2011), foi investigado o efeito inibitório de crescimento de vários flavonoides presentes nas folhas de soja selvagem (*Glycine*

*soja*) contra a espécie *Spodoptera litura*. Entre os metabólitos testados, a isoflavona daidzeína apresentou inibição significativa do crescimento das lagartas em três dias após alimentação com o composto isolado. Foi relatado que a *S. litura* não foi capaz de metabolizar o composto daidzeína, assim como observado no presente trabalho para a espécie *S. frugiperda*. Os autores sugerem que a daidzeína pode funcionar como um componente importante na defesa constitutiva contra insetos-praga em *Glycine soja*.

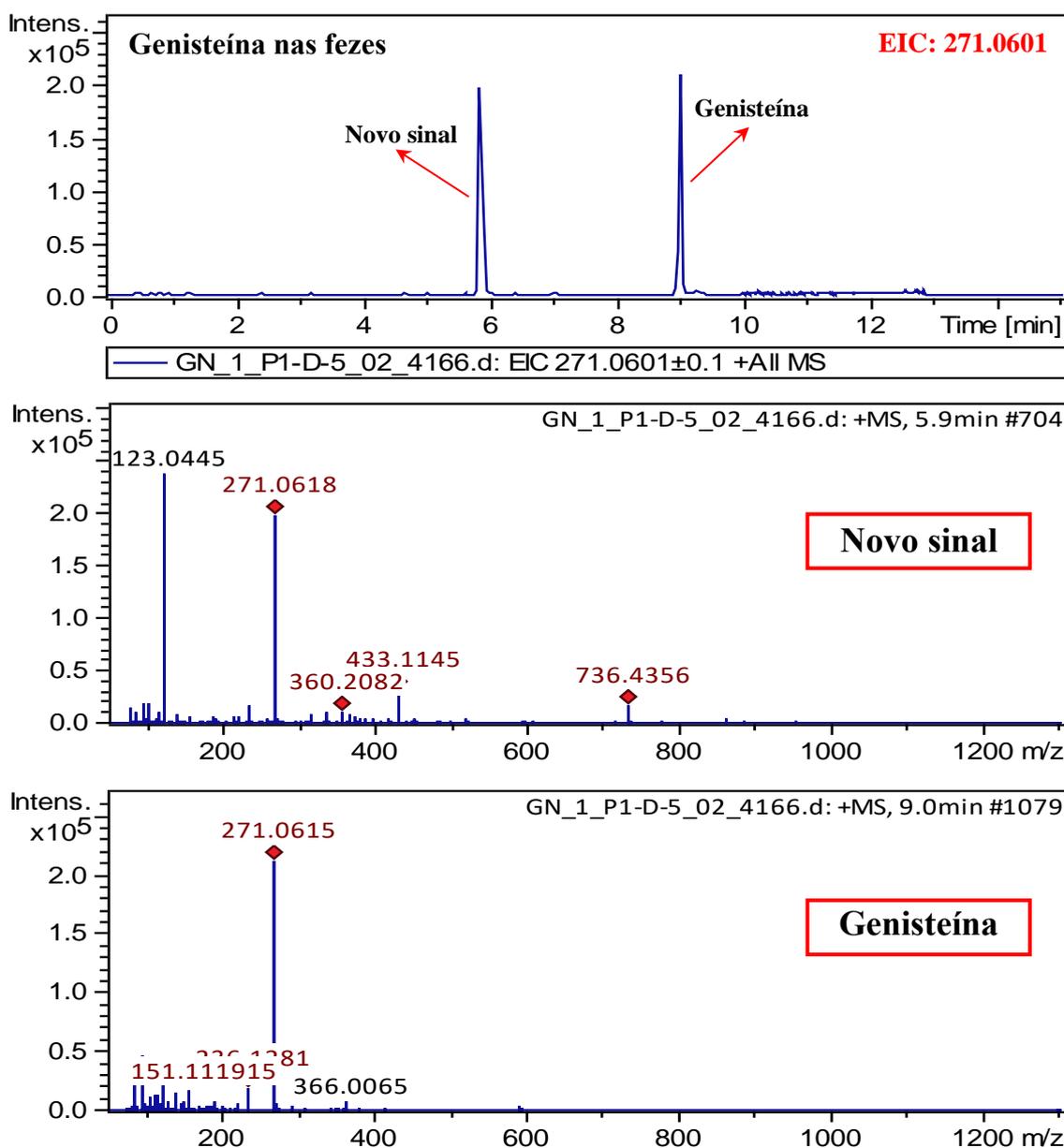
#### 4.3.2. Análise dos metabólitos encontrados nas fezes das lagartas alimentadas com genisteína

Na **Figura 22** é apresentado o BPC da amostra de genisteína isolada, no qual, nota-se a presença de traços de daidzeína provenientes do processo de isolamento. Todavia, assim como para a amostra de daidzeína, esse resíduo não comprometeu os resultados dos testes.



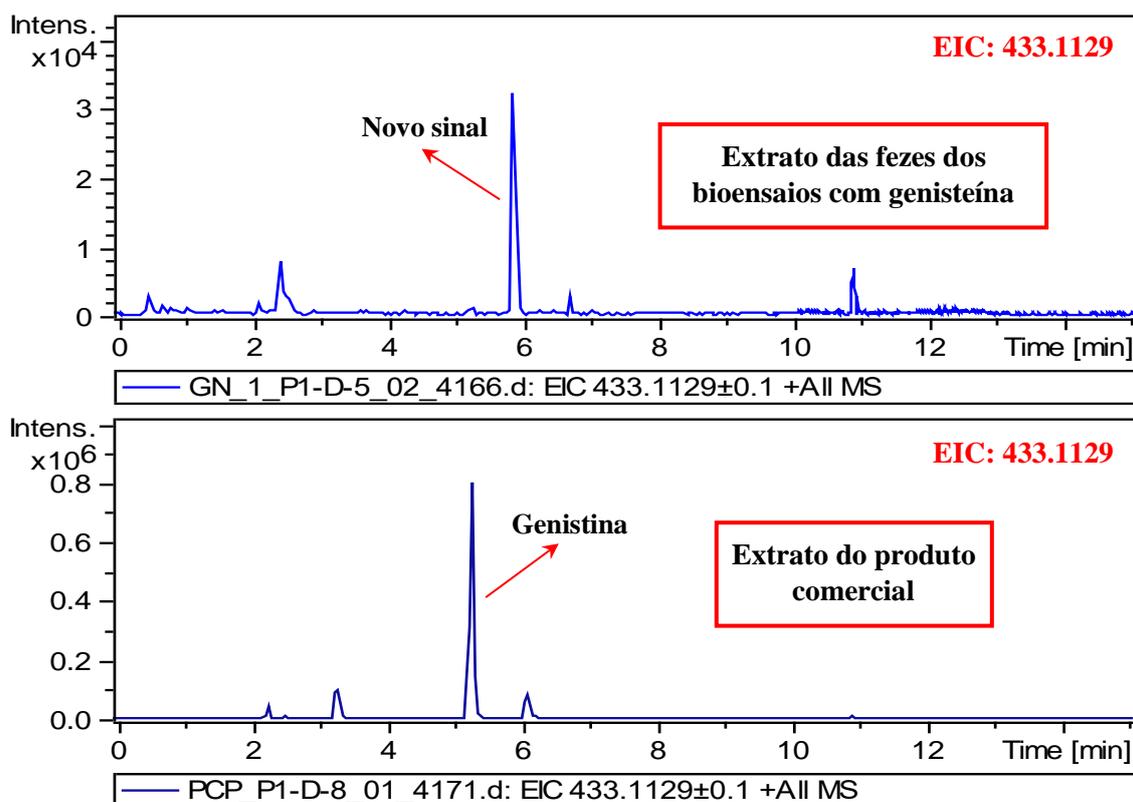
**Figura 22** - Cromatograma da isoflavona genisteína isolada.

No extrato das fezes das lagartas que se alimentaram de dieta contendo genisteína, foi possível observar através das análises do EIC ( $m/z$  271.0601), a detecção de um novo composto no tempo de retenção de 5,9 minutos e o sinal correspondente a aglicona genisteína em 9,0 minutos (**Figura 23**). Esse novo composto, também foi detectado nos bioensaios iniciais (**subseção 4.1 e Figura 12**).



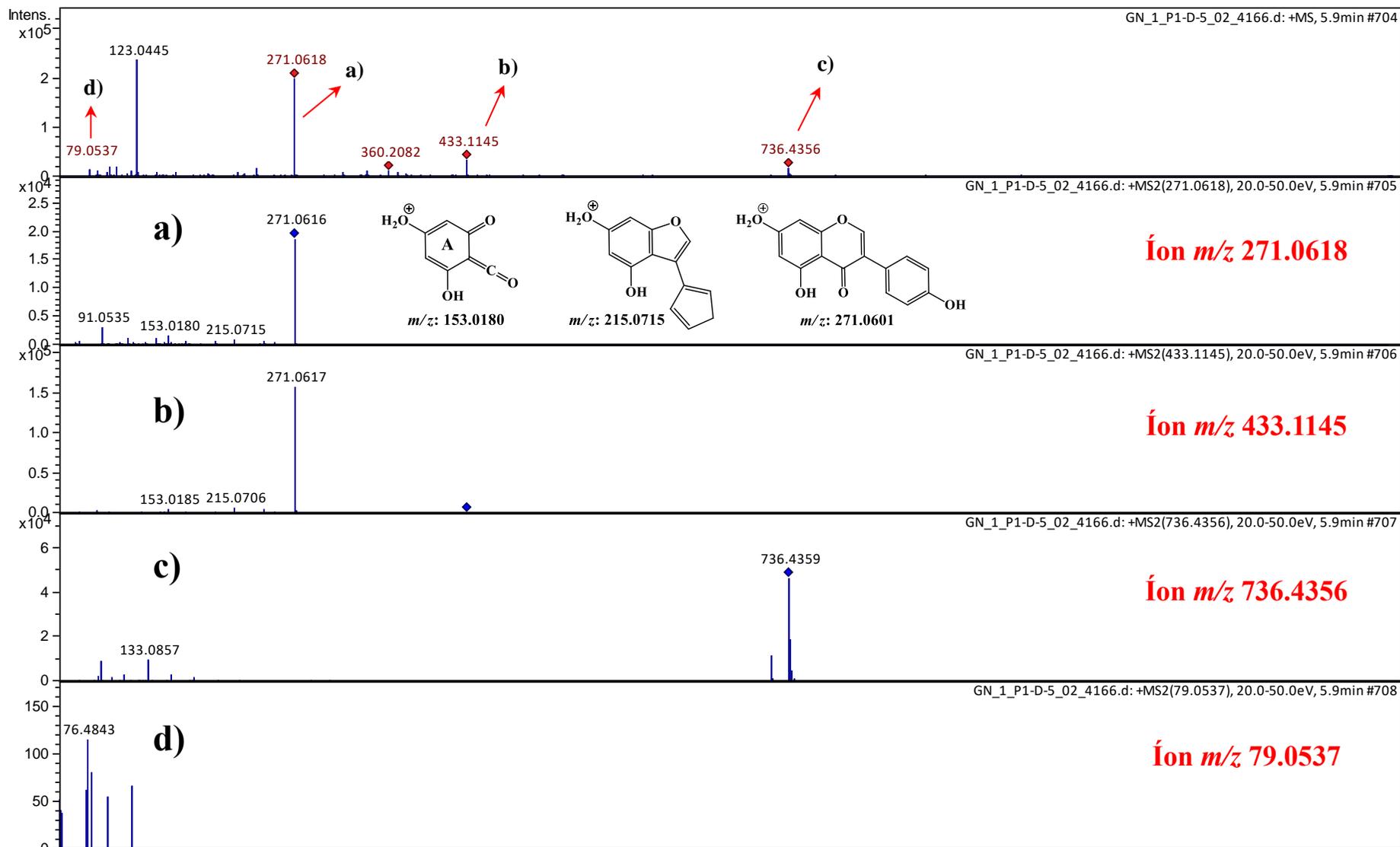
**Figura 23** – EIC e espectros de massas da genisteína e do novo composto presentes nas fezes de *S. frugiperda*.

Conforme a análise do espectro de massas do novo composto, a massa exata correspondente a esse sinal é de  $m/z$  433.1145, equivalente ao íon  $[M+H]^+$  da genistina (genisteína-7-*O*-glicosídeo). Porém, ao comparar os tempos de retenção sob as mesmas condições cromatográficas, observou-se uma diferença entre a genistina presente no extrato comercial (5,3 min) e o novo composto (5,9 min)(Figura 24).



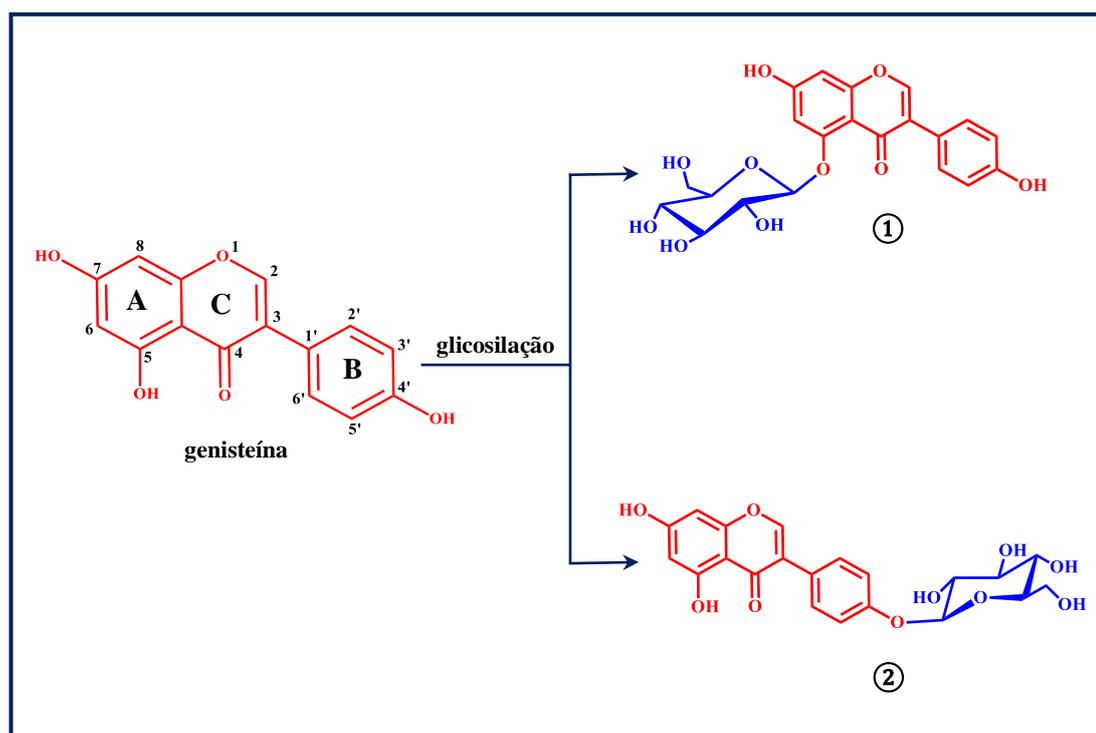
**Figura 24** – Comparação dos EICs do novo composto com genisteína.

Espectros de MS<sup>2</sup> (**Figura 25**) dos principais fragmentos do novo sinal foram investigados para obter mais informações sobre a estrutura desse metabólito. No espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  433.1145, pode-se observar a presença do íon produto de  $m/z$  271.0616 correspondente ao fragmento aglicona da genisteína, confirmando que esse novo metabólito é um glicosídeo de genisteína. O espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  271.0616 apresenta alguns fragmentos comuns da genisteína, tais como:  $^{1,3}A^+$  ( $m/z$  153,0180) e  $[M+H-2CO]^+$  ( $m/z$  215,0715) (COLDHAM et al., 1999; NAKATA *et al.*, 2018). Além disso, o espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  736.4359 observado nesse mesmo tempo de retenção não inclui nenhum dos sinais descritos anteriormente para a genisteína aglicona ou glicosídeo, confirmando que trata-se de outro composto coeluído.



**Figura 25** - Espectros de massas ( $MS^2$ ) correspondente ao novo composto encontrado nas fezes das lagartas.

Com base nisso, é possível sugerir que as lagartas de *S. frugiperda* conseguem metabolizar a isoflavona genisteína por glicosilação. Todavia, como esse composto apresenta a mesma massa exata da genistina e tempo de retenção diferente, essa diferença pode estar associada a um isômero, ou seja, o glicosídeo pode estar localizado no carbono 5 do anel A (composto 1) ou no 4' do anel B do flavonoide (composto 2). Os dois compostos (1 e 2) estão representados na **Figura 26**.



**Figura 26** - Esquema representativo para o metabolismo da isoflavona genisteína encontrada nas fezes de *S. frugiperda*.

Na literatura, foi relatado a capacidade que lepidópteros possuem para glicosilar flavonoides de forma regiosseletiva. Hirayama *et al.* (2008) estudaram o metabolismo de quercetina em larvas da espécie *Bombix mori*, e observaram que esta espécie se alimentava de dieta contendo quercetina e a biotransformava regiosseletivamente em quercetina 5-*O*-glicosídeo.

Os resultados dos bioensaios iniciais e com a daidzeína isolada, mostraram que as lagartas não metabolizaram essa isoflavona por glicosilação. Sugerindo que o inseto não seja capaz de glicosilar o composto na posição 4' do anel B, uma

vez que é conhecido da literatura que essa aglicona apresenta efeito deletério em insetos herbívoros (ZHOU *et al.*, 2011).

Nesse contexto, foi observado que a genisteína diglicosilada não foi detectada nos testes com a aglicona isolada. Esse diglicosídeo estava presente nas fezes dos insetos que se alimentaram de dieta contendo a mistura de isoflavonas, a qual tinha genistina. Pode-se levantar a hipótese de que as lagartas são capazes de glicosilar regioselectivamente na posição 5 do anel A do flavonoide, sendo que quando alimentadas com genistina (monoglicosídeo), consegue biotransformar em diglicosídeo e quando alimentadas com genisteína (aglicona), biotransforma em monoglicosídeo. Porém, testes com a genistina isolada e a purificação do composto encontrado nas fezes dos insetos são necessários para confirmar essa hipótese.

Além disso, a metabolização de genisteína e genistina foi relatada em *S. litura*. Nesse estudo, a genisteína foi metabolizada completamente e a genistina parcialmente. Outra observação interessante, é que esses dois compostos não afetaram o desenvolvimento do inseto, quando realizados testes de crescimento, bem como, não apresentaram atividade inibitória de alimentação (ZHOU *et al.* 2011). Entretanto, alguns estudos mostram que a genisteína pode estar envolvida na defesa da soja contra insetos e patógenos, apresentando efeitos negativos no comportamento e na biologia desses fitófagos (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2001; PIUBELLI *et al.*, 2003; GOŁAWSKA e ŁUKASIK, 2012; NAKATA *et al.*, 2016; BENTIVENHA *et al.*, 2018; KIKUTA, 2020).

Com base nos resultados adquiridos nesse trabalho e relatos da literatura, sugerimos que a metabolização da genisteína por *S. frugiperda* seja uma adaptação evolutiva de detoxificação do inseto. Além dessa espécie, Zhou *et al.* (2011), observaram que a *S. litura* também consegue metabolizar essa molécula, sugerindo que essa capacidade pode estar associada com lagartas do gênero *Spodoptera*. No entanto, testes com diferentes espécies do gênero *Spodoptera* e espécies de outros gêneros são necessários para confirmar essa observação.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise do perfil químico do produto comercial à base de soja, foi observado a presença das isoflavonas daidzeína, gliciteína, genisteína e suas formas glicosídicas, além dos acetilglicosídeos da daidzeína e gliciteína.

Nos bioensaios com lagartas de *S. frugiperda* utilizando dieta artificial contendo essa mistura de isoflavonas, foi detectada a presença de novos compostos derivados da genisteína, sugerindo que os insetos testados conseguiram metabolizar essa isoflavona. Entretanto, isso não foi observado para a daidzeína e gliciteína.

Em testes com as duas agliconas isoladas (daidzeína e genisteína), constatou-se que as lagartas não conseguiram metabolizar a daidzeína por glicosilação, e excretaram a aglicona não modificada nas fezes. Por outro lado, nos testes com genisteína, foi detectada a presença de um novo composto com massa idêntica à da genistina, porém com tempo de retenção diferente, representado assim um isômero desse glicosídeo. Isso sugere que *S. frugiperda* consegue metabolizar a genisteína por glicosilação, biotransformando-a em um isômero da genistina, aparentemente com o grupo glicosil na posição 5 do Anel A do flavonoide.

Por fim, esse trabalho foi o primeiro a investigar sobre o metabolismo de isoflavonas por *S. frugiperda*, servindo como base para futuros estudos sobre essa espécie e sua capacidade de metabolizar compostos bioativos, a qual pode estar associada ao seu status de inseto-praga. Assim, testes com enzimas poderão ser realizados para confirmar a atividade enzimática e descobrir o gene específico responsável, o qual proporcionará um novo alvo para o controle desse inseto. Além disso, novas pesquisas com diferentes insetos-praga da soja que apresentam o mesmo tipo de resistência da *S. frugiperda* e a triagem de outras plantas que produzem flavonoides como metabólitos de defesas, são importantes para fins de comparação.

## REFERÊNCIAS

- ALI, J. G; AGRAWAL, A. A. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. **Trends in plant science**. v. 17, p. 293-302, 2012.
- ARIMURA, G. I; MATSUI, K; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**. v. 50, p. 911-923, 2009.
- AZAM, M; ZHANG, S; ABDELGHANY, A. M; SHAIBU, A. S; FENG, Y; LI, Y; SUN, J. Seed isoflavone profiling of 1168 soybean accessions from major growing ecoregions in China. **Food Research International**. v. 130, p. 108957, 2020.
- BARROS, E. M; TORRES, J. B; RUBERSON, J. R; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 137, p. 237-245, 2010.
- BENTIVENHA, J. P; CANASSA, V. F; BALDIN, E. L; BORGUINI, M. G; LIMA, G. P; Lourenção, A. L. Role of the rutin and genistein flavonoids in soybean resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae). **Arthropod-plant interactions**. v. 12, p. 311-320, 2018.
- BERENBAUM, M. R; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current opinion in insect science**. v. 10, p. 51-58, 2015.
- BERNARDI, O. Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2012.
- BUENO, R. C. O. F; BUENO, A. F; MOSCARDI, F; POSTALI PARRA, J. R; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**. v. 67, p. 170-174, 2011.
- BUENO, R. C; RAETANO, C. G; JUNIOR, J. D; CARVALHO, F. K. Integrated management of soybean pests: the example of Brazil. **Outlooks on Pest Management**. v. 28, p. 149-153, 2017.
- CAPINERA, J. L. “Feature creatures: fall armyworm.” **Entomology & Nematology**, 1999, revisado em 2020. Disponível em ([https://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall\\_armyworm.htm#life](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm#life)), acessado dia 17/06/21.

CARNEIRO, A. M; MOREIRA, E. A; BRAGAGNOLO, F. S; BORGES, M. S; PILON, A. C; RINALDO, D; FUNARI, C. S. Soya agricultural waste as a rich source of isoflavones. **Food Research International**. v. 130, p. 108949, 2020.

CARTER JR, T. E; NELSON, R. L; SNELLER, C. H; CUI, Z. Genetic diversity in soybean. **Soybeans: Improvement, production, and uses**. v. 16, p. 303-416, 2004.

CASMUZ, A; JUÁREZ, M. L; SOCÍAS, M. G; MURÚA, M. G; PRIETO, S; MEDINA, S; GASTAMINZA, G. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**. v. 69, p. 209-231, 2010.

CATTELAN, A. J; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.

CHAHINE, S; O'DONNELL, M. J. Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Experimental Biology**. v. 214, p. 462-468, 2011.

CHATTERJEE, C; GLEDDIE, S; XIAO, C. W. Soybean bioactive peptides and their functional properties. **Nutrients**. v. 10, p. 1211, 2018.

COLDHAM, N. G; HOWELLS, L. C; SANTI, A; MONTESISSA, C; LANGLAIS, C; KING, L. J; SAUER, M. J. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentologyn. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**. v. 70, p. 169-184, 1999.

COSTA, J. O. **Perfil químico e dinâmica espacial e temporal de flavonoides de soja [*Glycine Max* (L.) Merr.]**. Orientador: Felipe Christoff Wouters. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 89, 2021.

CUNHA, C. P. D. Preparo de padrões de isoflavonas de *Glycine max* (L.) Merrill (soja) e contribuição na investigação fitoquímica de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (cumaru) - otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides. Dissertação de mestrado, p. 152, 2013.

DAIMON, T; HIRAYAMA, C; KANAI, M; RUIKE, Y; MENG, Y; KOSEGAWA, E; SHIMADA, T. The silkworm Green b locus encodes a quercetin 5-O-glucosyltransferase that produces green cocoons with UV-

shielding properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p. 11471-11476, 2010.

DANG, L; VAN DAMME, E. J. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**. v. 117, p. 51-64, 2015.

DEGRANDE, P. E; VIVAN, L. M. Pragas da soja. In: **Tecnologia e produção: soja e milho 2010/2011**. Maracaju: Fundação MS, p. 257, 2010.

DESPRES, L; DAVID, J; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in ecology & evolution**. v. 22, p. 298-307, 2007.

ERB, M; REYMOND, P. Molecular interactions between plants and insect herbivores. **Annual review of plant biology**. v. 70, p. 527-557, 2019.

FREITAS, M. M; SOUZA, B. H. S; NOGUEIRA, L; DI BELLO, M. M; JÚNIOR, A. L. B. Soybean defense induction to *Spodoptera cosmioides* herbivory is dependent on plant genotype and leaf position. **Arthropod-Plant Interactions**. v. 12, p. 85-96, 2018.

FROST, C. J; MESCHER, M. C; CARLSON, J. E; DE MORAES, C. M. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. **Plant physiology**. v. 146, p. 818-824, 2008.

GENOVESE, M. I; PINTO, M. D. S; BARBOSA, A. C. L; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de suplementos nutricionais à base de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, p. 159-167, 2003.

GOŁAWSKA, S; ŁUKASIK, I. Antifeedant activity of luteolin and genistein against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Pest Science**. v. 85, p. 443-450, 2012.

GOULD, K. S; LISTER, C. "Flavonoid functions in plants," in **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**, eds Ø. M. Andersen and K. R. Markham (Boca Raton: CRC Press), p. 397-442, 2006.

GRAHAM, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant physiology**. v. 95, p. 594-603, 1991.

GUZMÁN PRADA, D. A; RODRÍGUEZ, C. J; VALENCIA CATAÑO, S. J. Identification of Lepidoptera larval stages: a maize pest. **Identification of Lepidoptera larval stages: a maize pest**, 2018.

HANLEY, M. E; LAMONT, B. B; FAIRBANKS, M. M; RAFFERTY, C. M. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v. 8, p. 157-178, 2007.

HE, F. J; CHEN, J. Q. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. **Food Science and Human Wellness**. v. 2, p. 146-161, 2013.

HEIDEL-FISCHER, H. M; VOGEL, H. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. **Current opinion in insect science**. v. 8, p. 8-14, 2015.

HIRAYAMA, C; ONO, H; TAMURA, Y; KONNO, K; NAKAMURA, M. Regioselective formation of quercetin 5-O-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**. v. 69, p. 1141-1149, 2008.

HOFFMANN-CAMPO, C. B; HARBORNE, J. B; MCCAFFERY, A. R. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 98, p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C. B; OLIVEIRA, L. J; MOSCARDI, F; CORRÊA-FERREIRA, B. S; CORSO, I. C. Pragas que atacam plântulas, hastes e pecíolos da soja. Cap. 3. **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. Brasília, DF, p. 145-212, 2012.

HOWE, G. A; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual review of plant biology**. v. 59, p. 41-66, 2008.

International: World soybean production, 2019. Disponível em: <<http://soystats.com/international-world-soybean-production/>>. Acesso em: 01/06/2021.

JESCHKE, V; GERSHENZON, J; VASSÃO, D. G. A mode of action of glucosinolate-derived isothiocyanates: detoxification depletes glutathione and cysteine levels with ramifications on protein metabolism in *Spodoptera littoralis*. **Insect biochemistry and molecular biology**. v. 71, p. 37-48, 2016.

JOHNSON, M. T. J; CAMPBELL, S. A; BARRETT, S. C. H. Evolutionary interactions between plant reproduction and defense against herbivores. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, p. 191-213, 2015.

JONES, P; VOGT, T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. **Planta**. v. 213, p. 164-174, 2001.

JUNG, Y. S; RHA, C. S; BAIK, M. Y; BAEK, N. I; KIM, D. O. A brief history and spectroscopic analysis of soy isoflavones. **Food Science and Biotechnology**. v. 29, p. 1605-1617, 2020.

KARBAN, R; BALDWIN, I. T. Induced responses to herbivory. **University of Chicago Press**, 2007.

KENNEDY, C. J; TIERNEY, K. B. Xenobiotic protection/resistance mechanisms in organisms. **In: Environmental Toxicology**. Springer, New York, NY, p. 689-721, 2013.

KHAN, Z. R; WARD, J. T; NORRIS, D. M. Role of trichomes in soybean resistance to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Entomologia experimentalis et applicata**. v. 42, p. 109-117, 1986.

KIKUTA, S. The Cytotoxic Effect of Genistein, a Soybean Isoflavone, against Cultured *Tribolium* Cells. **Insects**. v. 11, p. 241, 2020.

KIM, M. Y; SUNGHOON, L; KYUJUNG, V; TAE-HYUNG, K; SOON-CHUN, J; IK-YOUNG, C; DAE-SOO, K. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p. 22032-22037, 2010.

KOFSKY, J; ZHANG, H; SONG, B. H. The untapped genetic reservoir: the past, current, and future applications of the wild soybean (*Glycine soja*). **Frontiers in plant science**. v. 9, p. 949, 2018.

KONNO, K; HIRAYAMA, C; SHINBO, H. Glycine in digestive juice: a strategy of herbivorous insects against chemical defense of host plants. **Journal of insect physiology**. v. 43, p. 217-224, 1997.

KREMPL, C; SPORER, T; REICHEL, M; AHN, S. J; HEIDEL-FISCHER, H; VOGEL, H; JOUBEN, N. Potential detoxification of gossypol by UDP-glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. **Insect biochemistry and molecular biology**. v. 71, p. 49-57, 2016.

LI, X; BAUDRY, J; BERENBAUM, M. R; SCHULER, M. A. Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: from specialist to generalist

cytochrome P450. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, p. 2939-2944, 2004.

LI, X; SCHULER, M. A; BERENBAUM, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual review of entomology**. v. 52, p. 231-253, 2007.

MAAG, D; ERB, M; KÖLLNER, T. G; GERSHENZON, J. Defensive weapons and defense signals in plants: some metabolites serve both roles. **BioEssays**. v. 37, p. 167-174, 2015.

MARTINS, J. D. S; DA ROSA, A. P. S. A. Importância econômica de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) como praga do arroz no Brasil. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

MASSEY, F. P; HARTLEY, S. E. Physical defences wear you down: progressive and irreversible impacts of silica on insect herbivores. **Journal of Animal Ecology**. v. 78, p. 281-291, 2009.

MATHESIUS, U. Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. **Plants**. v. 7, v. 30, 2018.

MERTENS, D; BOEGE, K; KESSLER, A; KORICHEVA, J; THALER, J. S; WHITEMAN, N. K; POELMAN, E. H. Predictability of Biotic Stress Structures Plant Defence Evolution. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 36, p. 444-456, 2021.

MITHÖFER, A; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**. v. 63, p. 431-450, 2012.

MONTEZANO, D. G; SPECHT, A; SOSA-GÓMEZ, D. R; ROQUE-SPECHT, V. F; SOUSA-SILVA, J. C; PAULA-MORAES, S. D; HUNT, T. E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**. v. 26, p. 286-300, 2018.

MORANT, A. V; JØRGENSEN, K; JØRGENSEN, C; PAQUETTE, S. M; SÁNCHEZ-PÉREZ, R; MØLLER, B. L; BAK, S.  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**. v. 69, p. 1795-1813, 2008.

MOREIRA, H. J. C; ARAGÃO, F. D. Manual de pragas da soja. **Agrolink**. Campinas-SP, p. 144. 2009.

MUNRO, I. C; HARWOOD, M; HLYWKA, J. J; STEPHEN, A. M; DOULL, J; FLAMM, W. G; ADLERCREUTZ, H. Soy isoflavones: a safety review. **Nutrition reviews**. v. 61, p. 1-33, 2003.

MURAKAMI, S; NAKATA, R; ABOSHI, T; YOSHINAGA, N; TERAISHI, M; OKUMOTO, Y; MORI, N. (2014). Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves. **Metabolites**. v. 4, p. 532-546, 2014.

NAKATA, R; KIMURA, Y; AOKI, K; YOSHINAGA, N; TERAISHI, M; OKUMOTO, Y; MORI, N. Inducible de novo biosynthesis of isoflavonoids in soybean leaves by *Spodoptera litura* derived elicitors: tracer techniques aided by high resolution LCMS. **Journal of chemical ecology**. v. 42, p. 1226-1236, 2016.

NAKATA, R; YOSHINAGA, N; TERAISHI, M; OKUMOTO, Y; HUFFAKER, A; SCHMELZ, E. A; MORI, N. A fragmentation study of isoflavones by IT-TOF-MS using biosynthesized isotopes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. v. 82, p. 1309-1315, 2018.

NEGRA , B. L. D. **METABOLISMO DE FLAVONOIDES POR *Spodoptera frugiperda* E *Anticarsia gemmatalis***. Orientador: Felipe Christoff Wouters. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 99, 2019.

ODE, P. J. Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions. **Annual Review Entomology**. v. 51, p. 163-185, 2006.

OLIVEIRA, C. M; AUAD, A. M; MENDES, S. M; Frizzas, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**. v. 56, p. 50-54, 2014.

OPITZ, S. E; MÜLLER, C. Plant chemistry and insect sequestration. **Chemoecology**. v. 19, p. 117-154, 2009.

OPITZ, S. E; JENSEN, S. R; MÜLLER, C. Sequestration of glucosinolates and iridoid glucosides in sawfly species of the genus *Athalia* and their role in defense against ants. **Journal of chemical ecology**. v. 36, p. 148-157, 2010.

ORHAN, I; OZCELIK, B; KARTAL, M; ASLAN, S; SENER, B; OZGUVEN, M. Quantification of daidzein, genistein and fatty acids in soybeans and soy sprouts, and some bioactivity studies. **Acta Biol Cracov**. v. 49, p. 61-68, 2007.

PENTZOLD, S; ZAGROBELNY, M; ROOK, F; BAK, S. How insects overcome two-component plant chemical defence: plant  $\beta$ -glucosidases as the main target for herbivore adaptation. **Biological Reviews**. v. 89, p. 531-551, 2014.

PICHERSKY, E; EFRAIM, L. Convergent evolution in plant specialized metabolism. **Annual review of plant biology**. v. 62, p. 549-566, 2011.

PIUBELLI, G. C; HOFFMANN-CAMPO, C. B; ARRUDA, I. C. D; LARA, F. M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.)(Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical entomology**. v. 32, p. 127-132, 2003.

PIUBELLI, G. C; HOFFMANN-CAMPO, C. B; MOSCARDI, F; MIYAKUBO, S. H; DE OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?. **Journal of chemical ecology**. v. 31, p. 1509-1525, 2005.

PRICE, P. W; DENNO, R. F; EUBANKS, M. D; FINKE, D. L; KAPLAN, I. **Insect ecology: behavior, populations and communities**. Cambridge University Press. New York, 2011.

RAMACHANDRAN, R; NORRIS, D. M; PHILLIPS, J. K; PHILLIPS, T. W. Volatiles mediating plant-herbivore-natural enemy interactions: soybean looper frass volatiles, 3-octanone and guaiacol, as kairomones for the parasitoid *Microplitis demolitor*. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 39, p. 2310-2317, 1991.

SARMENTO, R. A; AGUIAR, R. W. S; AGUIAR, R. A. S. S; VIEIRA, S. M. J; OLIVEIRA, H. G; HOLTZ, A. M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**. v.18, n. 2, p. 41-48, 2002.

SALMINEN, J. P; LAHTINEN, M; LEMPA, K; KAPARI, L; HAUKIOJA, E; PIHLAJA, K. Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v. 59, p. 437-444, 2004.

SCHNEIDER, A. *et al.* Manual de pragas do milho, soja e algodão. **Sementes Agroceres**, 148p, 2013.

SCHRAMM, K; VASSÃO, D. G; REICHEL, M; GERSHENZON, J; WITTSTOCK, U. Metabolism of glucosinolate-derived isothiocyanates to

glutathione conjugates in generalist lepidopteran herbivores. **Insect biochemistry and molecular biology**. v. 42, p. 174-182, 2012.

SILVA, P. L. D; CORDEIRO, G; SILVA, C. R; BARROS, R. A; ZANUNCIO, J. C; OLIVEIRA, M. G. Does mechanical damage on soybean induces the production of flavonoids?. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 3415-3422, 2018.

SMITH, J. E. The natural history of the rarer lepidopterous Insects of Georgia, 191p, 1797.

SORENSEN, J. S; DEARING, M. D. Efflux transporters as a novel herbivore counter-mechanism to plant chemical defenses. **Journal of chemical ecology**. v. 32, p. 1181-1196, 2006.

SUNG, J. H; CHOI, S. J; LEE, S. W; PARK, K. H; MOON, T. W. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. v. 68, p. 1051-1058, 2004.

SPAGNUOLO, C; RUSSO, G. L; ORHAN, I. E; HABTEMARIAM, S; DAGLIA, M; SUREDA, A; Nabavi, S. M. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. **Advances in nutrition**. v. 6, p. 408-419, 2015.

SPEED, M. P; FENTON, A; JONES, M. G; RUXTON, G. D; BROCKHURST, M. A. Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants. **New Phytologist**. v. 208, p.1251-1263, 2015.

UEDA, T. E. **Metabólitos secundários da soja como indicadores de alimentação na fase larval de *Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens***. Dissertação de mestrado. Londrina, p. 100, 2015.

United States Department of Agriculture (USDA) – World Agricultural Production. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 01/06/2021.

VACEK, J; KLEJDUS, B; LOJKOVÁ, L; KUBÁN, V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: a review. **Journal of separation Science**. v. 31, p. 2054-2067, 2008.

VAN LEEUWEN, T; DERMAUW, W. The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in chelicerate mites. **Annual review of entomology**. v. 61, p. 475-498, 2016.

WANG, J; SPORNS, P. MALDI-TOF MS analysis of isoflavones in soy products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5887-5892, 2000.

WAR, A. R; PAULRAJ, M. G; AHMAD, T; BUHROO, A. A; HUSSAIN, B; IGNACIMUTHU, S; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**. v. 7, p. 1306-1320, 2012.

WAR, A. R; SHARMA, H. C. Induced resistance in plants and counter-adaptation by insect pests. **Short views on insect biochemistry and molecular biology**. p. 1-16, 2014.

WAR, A. R; TAGGAR, G. K; HUSSAIN, B; TAGGAR, M. S; NAIR, R. M; SHARMA, H. C. Plant defence against herbivory and insect adaptations. **AoB Plants**. v. 10, ply037, 2018.

WEGULO, S. N; YANG, X. B; MARTINSON, C. A; MURPHY, P. A. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. **Canadian Journal of plant Science**. v. 85, p. 749-760, 2005.

WINDE, I; WITTSTOCK, U. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate–myrosinase system. **Phytochemistry**. v. 72, p. 1566-1575, 2011.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**. v. 64, p. 3-19, 2003.

WITTSTOCK, U; GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current opinion in plant biology**. v. 5, p. 300-307, 2002.

WOUTERS, F. C; REICHEL, M; GLAUSER, G; BAUER, E; ERB, M; GERSHENZON, J; VASSÃO, D. G. Reglucosylation of the benzoxazinoid DIMBOA with inversion of stereochemical configuration is a detoxification strategy in lepidopteran herbivores. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 53, p. 11320-11324, 2014.

WOUTERS, F. C. Detoxification and metabolism of maize benzoxazinoids by lepidopteran herbivores. **Tese de Doutorado**. Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2016.

XIA, J; GUO, Z; YANG, Z; HAN, H; WANG, S; XU, H; ZHANG, Y. Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins. **Cell**. v. 184, p. 1693-1705, 2021.

XU, J; STRANGE, J. P; WELKER, D. L; JAMES, R. R. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). **BMC genomics**. v. 14, p. 1-13, 2013.

YANG, B; LIU, H; YANG, J; GUPTA, V. K; JIANG, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. **Trends in food science & technology**. v. 79, p. 116-124, 2018.

ZHOU, Y. Y; LUO, S. H; YI, T. S; LI, C. H; LUO, Q; HUA, J; LI, S. H. Secondary metabolites from *Glycine soja* and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 59, p. 6004-6010, 2011.

ZHU, F; MOURAL, T. W; NELSON, D. R; PALLI, S. R. A specialist herbivore pest adaptation to xenobiotics through up-regulation of multiple Cytochrome P450s. **Scientific reports**. v. 6, p. 1-10, 2016.