

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

**“METABOLISMO DE FLAVONOIDES POR *Spodoptera
frugiperda* E *Anticarsia gemmatalis*”**

Bruno Luis Della Negra

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

Orientador: Felipe Christoff Wouters

Bolsista CAPES

**São Carlos - SP
2019**

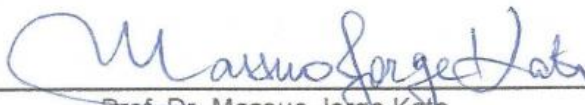


Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Bruno Luis Della Negra, realizada em 19/08/2019:



Prof. Dr. Felipe Cristoff Wouters
UFSCar



Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
USP



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar

Agradecimentos:

Agradeço aos meus pais, pelo apoio emocional e financeiro durante a realização do projeto;

Ao professor Felipe Wouters, pela paciência, orientação e conhecimentos compartilhados;

À professora Regiane Cristina de Oliveira Freitas Bueno, por fornecer os insetos e compartilhar conhecimentos e experiências valiosas em relação a criação das lagartas.

À Bruna Fuentes, pelos momentos de descontração e apoio emocional durante a realização do mestrado.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda com os equipamentos e pelos bons tempos passados durante a realização dos experimentos.

Aos órgãos de fomento, principalmente a CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Aos amigos de república, pela parceria e convivência no período em que residi em São Carlos.

Lista de Tabelas

TABELA 1.1: Exemplos de defesas químicas de plantas.	5
TABELA 1.2: Angulos de torção de diferentes flavonoides de acordo com a substituição na posição 3.	17
TABELA 4.3: Perfomance das lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas a concentrações de rutina e quercetina.	28
TABELA 4.4: Perfomance das lagartas de <i>A. gemmatalis</i> submetidas a concentrações de rutina e quercetina.	30
TABELA 4.5: Metabólitos encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo 8 μ mol de quercetina.	34
TABELA 4.6: Metabólitos de quercetina encontrados nas fezes de <i>A. gemmatali</i> alimentada com 8 μ mol de quercetina.	35
TABELA 4.7: Metabólitos de rutina encontrados nas fezes <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo 8 μ mol de rutina.	50
TABELA 4.8: Metabólitos de rutina encontrados nas fezes <i>A. gemmatalis</i> alimentada com dieta contendo 8 μ mol de rutina.	50
TABELA 4.9: Metabólitos de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta contendo naringenina.	55
TABELA 4.10: Metabólitos de naringenina encontrados nas fezes de <i>A. gemmatalis</i> alimentada com dieta contendo naringenina.	55
Tabela 4.11: Quantidade e variedade de metabólitos encontrados nos extratos de fezes de <i>A. gemmatalis</i> e <i>S. frugiperda</i> ingerindo dietas contendo quercetina, naringenina ou rutina.	68

Lista de Figuras:

FIGURA 1.1: <i>S. frugiperda</i> nas fases de lagarta e adulto	2
FIGURA 1.2: <i>A. gemmatalis</i> larva e adulto	3
FIGURA 1.3: Fases do metabolismo de xenobióticos em insetos	13
FIGURA 1.4: Estrutura geral de flavonóis e principais sítios da quercetina capazes de estabilizar um radical	15
FIGURA 1.5: Mecanismo de estabilização radicalar via ortoquinona	16
FIGURA 1.6: Mecanismo de estabilização do radical pelas funções presentes no anel C	16
FIGURA 1.7: Principais sítios para a complexação com metais de transição	18
FIGURA 1.8: Atividade pró-oxidante dos flavonoides.....	19
FIGURA 4.9: Taxa de crescimento relativo de <i>S. frugiperda</i> se alimentando de dietas com concentrações diferentes de flavonoides.....	29
FIGURA 4.10: Taxa de crescimento relativo de <i>A. gemmatalis</i> se alimentando em dietas com concentrações diferentes de flavonoides.	31
FIGURA 4.11: Cromatogramas de EIC para os tri-glicosídeos de quercetina encontrados nos extratos de fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.	38
FIGURA 4.12: Cromatograma EIC para os di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.	39
FIGURA 4.13: Cromatograma EIC para os metil-di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.	40
FIGURA 4.14: Cromatograma EIC para os derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de quercetina encontradas nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.....	42
FIGURA 4.15: Cromatograma EIC para os derivados metil-sulfo-glicosilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.	43
Figura 4.16: Cromatograma EIC para a isoquercetina encontrada nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.....	44

FIGURA 4.17: Experimento de <i>spike</i> com isoquercetina nos extratos de fezes de <i>S. frugiperda</i>	44
FIGURA 4.18: Cromatograma de EIC e espectros de MS/MS para os metil-mono-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.....	45
FIGURA 4.19: Cromatograma EIC para os derivados sulfatados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.....	46
FIGURA 4.20: Cromatograma EIC para os derivados sulfo-metilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.....	47
FIGURA 4.21: Cromatograma EIC para os metabólitos metilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.....	49
FIGURA 4.22: Cromatogramas EIC para a rutina glicosilada encontrada nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo rutina.....	51
FIGURA 4.23: Cromatograma EIC para os metabólitos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo rutina.....	52
FIGURA 4.24: Cromatogramas EIC os metabólitos metilados de rutina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo rutina.....	53
FIGURA 4.25: Cromatograma EIC para os di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.....	56
FIGURA 4.26: Cromatograma EIC para os di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.....	57
FIGURA 4.27: Mono-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.....	58
FIGURA 4.28: Cromatograma EIC para os derivados sulfatados de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> , ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.....	59

FIGURA 4.29: Cromatogramas EIC para os metabólitos di-glicosilados encontrados nos ensaios enzimáticos com <i>S. frugiperda</i> e nas fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta de quercetina.....	60
FIGURA 4.30: Cromatogramas EIC para os metabólitos de quercetina mono-glicosilados encontrados nos ensaios enzimáticos com <i>S. frugiperda</i> e nos extratos das fezes <i>S. frugiperda</i>	61
Figura 4.31: Cromatogramas EIC para os metabólitos glicosilados de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos e nas fezes de <i>S. frugiperda</i>	62
Figura 4.32: Cromatogramas de EIC para os metabólitos mono-glicosilados de quercetina encontrados nos ensaios enzimáticos e nas fezes de <i>A. gemmatalis</i>	63
Figura 4.33: Cromatogramas de EIC encontrados para os metabólitos glicosilados de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos utilizando rutina e UDP-glicose como substratos e nas fezes de <i>A. gemmatalis</i>	64
FIGURA A.1: Cromatogramas de EIC das fezes dos grupos controle para os insetos estudados.	82
FIGURA A.2: Cromatogramas de EIC para os padrões dos compostos utilizados nos experimentos.	82
FIGURA A.3: Cromatograma de EIC para os grupos controle dos ensaios enzimáticos.....	83
FIGURA A.4: Espectros de MS/MS dos tri-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>A. gemmatalis</i> e <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.	84
FIGURA A.5: Espectros de MS/MS dos di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.	85
FIGURA A.6: Espectros de MS/MS dos metil-di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.....	86
FIGURA A.7: Espectros de MS/MS para os derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.	87
FIGURA A.8. Espectros de HRMS dos derivados metil-sulfo-glicosilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.	87

FIGURA A.9. Espectros de MS/MS da isoquercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.	88
FIGURA A.10: Espectros de MS/MS dos metil-mono-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo quercetina.....	88
FIGURA A.11: Espectros de MS/MS dos derivados sulfatados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentada com quercetina.	89
FIGURA A.12: Espectros de MS/MS dos derivados sulfo-metilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentada com dieta contendo quercetina.....	89
FIGURA A.13: Cromatograma e espectros de MS/MS da quercetina encontrada sem modificações nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentada com dieta contendo quercetina.....	90
FIGURA A.14: Espectros de MS/MS e HRMS dos derivados metilados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentada com quercetina.	91
FIGURA A.15: Espectros de MS/MS dos glicosídeos de rutina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo rutina.....	91
FIGURA A.16: Espectros de MS/MS dos derivados de quercetina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo rutina.	92
FIGURA A.17: Espectros de HRMS dos derivados metilados de rutina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentada com dieta contendo rutina.	92
FIGURA A.18: Cromatograma e espectros de MS/MS da rutina encontrada sem modificações nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo rutina.	93
FIGURA A.19: Espectros de MS/MS dos di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo naringenina.	94
FIGURA A.20: Espectros de MS/MS dos sulfo-glicosilados de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta contendo naringenina.	95

FIGURA A.21: Espectros de MS/MS dos mono-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo naringenina.....	95
FIGURA A.22: Espectros de MS/MS dos derivados sulfatados de naringenina encontrados nas fezes de <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com dieta contendo naringenina.....	96
FIGURA A.23: Cromatograma e espectros de MS/MS da naringenina encontrada sem modificações nas fezes de <i>A. gemmatalis</i> e <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta contendo naringenina.....	97
FIGURA A.24: Espectros de HRMS dos di-glicosídeos de quercetina encontrados nos ensaios enzimáticos com <i>S. frugiperda</i> utilizando UDP-glicose e quercetina como substratos.....	98
FIGURA A.25: Espectro de HRMS da isoquercetina encontrada nos ensaios enzimáticos com <i>S. frugiperda</i> utilizando UDP-glicose e quercetina como substratos.	99
FIGURA A.26: Espectros de HRMS dos glicosídeos de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos com <i>S. frugiperda</i> utilizando UDP-glicose e rutina como substratos.	99
FIGURA A.27: Espectro de HRMS dos glicosídeos de quercetina encontrados nos ensaios enzimáticos com <i>A. gemmatalis</i> utilizando UDP-glicose e quercetina como substratos.	100
FIGURA A.28: Espectros de HRMS dos glicosídeos de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos com <i>A. gemmatalis</i> utilizando UDP-glicose e rutina como substratos.	100

Resumo:

METABOLISMO DE FLAVONOIDES POR *Spodoptera frugiperda* E *Anticarsia gemmatalis*. A soja (*Glycine max* L. Merrill) produz uma série de flavonoides como metabólitos secundários, conhecidos por causarem dano em insetos herbívoros. Mesmo assim, *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) conseguem se alimentar das folhas da soja, causando grandes prejuízos nas lavouras do Brasil. Surpreendentemente, pouco se sabe sobre como esses insetos metabolizam os flavonoides da soja e sobre como essa capacidade explica o seu *status* de praga agrícola. Com isso em mente, o presente trabalho se propõe a avaliar a toxicidade dos flavonoides modelo quercetina e rutina no desenvolvimento de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, assim como elucidar as rotas metabólicas utilizadas por esses insetos para minimizar os efeitos tóxicos desses flavonoides. Para isso, os insetos foram criados em dietas artificiais contendo quercetina e rutina. Foram medidas a duração dos estágios de vida, a massa das lagartas e a mortalidade dos indivíduos. Amostras de fezes foram analisadas via LC-MS para identificação dos metabólitos de quercetina e rutina, além de naringenina. Ensaio enzimáticos *in vitro* com o intestino médio dos insetos também foram realizados com quercetina e rutina juntamente com UDP-glicose, com objetivo de confirmar a produção dos metabólitos glicosilados encontrados nas fezes. Quercetina e rutina mostram toxicidade na dieta, resultando em menores massas da lagarta e maior duração do estágio larval para ambas as espécies. Foram encontrados metabólitos glicosilados, metilados e sulfatados nos extratos de fezes, além de di- e triglicosídeos e combinações dessas funcionalizações, incluindo diferentes regio-isômeros. *S. frugiperda* também produziu metabólitos fosfatados de quercetina e naringenina. As duas espécies metabolizam quercetina, rutina e naringenina, gerando compostos possivelmente menos tóxicos. Alguns glicosídeos também foram observados em ensaios enzimáticos, confirmando a atividade de UDP-glicosiltransferases no metabolismo de flavonoides. Os experimentos realizados fornecem dados qualitativos sobre as reações bioquímicas empregadas por *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* no metabolismo de flavonoides e contribuem para futuros estudos sobre suas interações com plantas-hospedeiras quimicamente defendidas.

Abstract:

FLAVONOID METABOLISM BY *Spodoptera frugiperda* AND *Anticarsia gemmatalis*. The soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) produces a range of flavonoids as secondary metabolites, known to cause damage to herbivorous insects. However, *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) can feed on soybean leaves, causing great losses in Brazilian crops. Surprisingly, little is known about how these insects metabolize soybean flavonoids, and how their metabolism explains their status as agricultural pests. Therefore, the present work aims to evaluate the toxicity of model flavonoids quercetin and rutin in the development of *S. frugiperda* and *A. gemmatalis*, in addition to elucidate the metabolic strategies used by these insects to deal with flavonoid toxicity. The insects were reared in artificial diets containing quercetin and rutin. Larval weights, larval stage durations, and mortality were followed during the experiments. Feces samples from caterpillars were analyzed by LC-MS to identify metabolites from quercetin and rutin, as well as naringenin. *In vitro* enzymatic assays with insect midgut tissue using quercetin and rutin together with UDP-glucose were performed in order to confirm the production of glucosylated metabolites found in feces. Quercetin and rutin showed toxicity in the diet, resulting in lower larval weights and longer larval stages for both insect species. Glucosylated, methylated, and sulfonated derivatives were detected in feces extracts, as well as di- and tri-glucosides and combinations of these functionalizations, including different regioisomers. *S. frugiperda* also produced phosphorylated metabolites of quercetin and naringenin. Both species are able to metabolize quercetin, rutin and naringenin, generating potentially less toxic compounds. Some glycosides were also observed in enzymatic assays, confirming the activity of UDP-glucosyltransferases in flavonoid metabolism. The experiments presented here provide qualitative data about the biochemical reactions employed by *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* in flavonoid metabolism and contribute to future studies on their interactions with chemically defended host-plants.

Sumário

1 – Introdução	1
1.1 - Principais pragas da soja	1
1.2 - Mecanismos de defesa das plantas	3
1.2.1 Flavonoides e isoflavonas como defesas químicas	6
1.3 - Mecanismos de defesa dos insetos	10
1.4 – Relação estrutura – propriedade anti/pró-oxidante de flavonoides	14
1.5 – Outras relações ecológicas envolvendo flavonoides e isoflavonas.....	20
2 – Objetivos	22
3 - Procedimento Experimental	23
3.1 - Criação de insetos	23
3.2 – Bioensaios	24
3.3 - Análise de Dados	25
3.4 - Extração e Preparo de Amostra	26
3.5 - Ensaio Enzimáticos	26
3.6 - Análises cromatográficas e espectrométricas	27
4 - Resultados e Discussão.....	28
4.1 - Bioensaios com <i>S. frugiperda</i>	28
4.2 - Bioensaios com <i>A. gemmatalis</i>	30
4.3 - Toxicidade de flavonoides e preferências alimentares	32
4.4 – Identificação dos metabólitos presentes nas fezes.....	32
4.4.1 – Metabólitos encontrados nas fezes dos insetos alimentados com quercetina.	33
4.4.1.1 – Tri-glicosídeos de quercetina	37
4.4.1.2 – Di-glicosídeos de quercetina	38
4.4.1.3 – Metil-di-glicosídeos de quercetina.	39
4.4.1.4 – Derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de quercetina.....	40
4.4.1.5 – Derivado metil-sulfo-glicosilado de quercetina.....	42

4.4.1.6 – Isoquercetina.....	43
4.4.1.7 – Metil-mono-glicosídeos de quercetina	44
4.4.1.8 – Derivados sulfatados de quercetina	45
4.4.1.9 – Derivados sulfo-metilados de quercetina	46
4.4.1-10 – Derivados metilados de quercetina	47
4.4.2 – Metabólitos encontrados nas fezes dos insetos alimentados com rutina.....	49
4.4.2.1 – Glicosídeos de rutina.....	51
4.4.2.2 – Derivados de quercetina.....	51
4.4.2.3 – Metilados de rutina	52
4.4.3 – Metabólitos encontrados nas fezes dos insetos alimentados com naringenina	54
4.4.3.1 – Di-glicosídeos de naringenina	55
4.4.3.2 – Derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de naringenina.....	56
4.4.3.3 – Mono-glicosídeos de naringenina	57
4.4.3.4 – Derivados sulfatados de naringenina	58
4.5 – Ensaio enzimáticos.....	59
4.5.1 – Ensaio enzimáticos com <i>S. frugiperda</i>	60
4.5.2 – Ensaio enzimáticos com <i>A. gemmatalis</i>	62
4.5.3 - Reações e enzimas envolvidas	64
4.6 – <i>S. frugiperda</i> e <i>A. gemmatalis</i> : diferenças na relação com flavonoides presentes na dieta.....	67
4.7 – Conclusões	69
5 – Referências	72
Apêndice	82

1 – Introdução

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é o grão mais plantado no Brasil desde 2014, ajudando a movimentar a economia brasileira e sendo utilizada em várias áreas, como nutrição e pecuária (MAPA, 2018). É conhecido da literatura que a soja produz uma série de metabólitos secundários tóxicos para insetos mastigadores (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; FRANCO et al., 2016; GRAHAM, 1991; ZHOU et al., 2011). Mesmo assim, alguns insetos da ordem Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) são conhecidos por causarem grandes prejuízos às culturas de soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012). Surpreendentemente, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais esses insetos conseguem tolerar os compostos tóxicos produzidos pela planta.

1.1 - Principais pragas da soja

No Brasil, lepidópteros mastigadores tem um impacto muito grande nas lavouras de soja. Como pragas ocasionais e com maior ocorrência em climas secos e de baixa precipitação, esses insetos são muito comuns no centro-oeste do país. Entre os representantes dessa classe de pragas estão *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, ambos da família Noctuidae.

S. frugiperda é conhecida popularmente como “lagarta militar” ou “lagarta do cartucho” (Figura 1.2). O inseto se alimenta de várias culturas, atuando como praga ocasional da soja. Causa maior dano em climas secos e nos primeiros estágios de vida da planta (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012). Mediante a superpopulação, as lagartas do inseto adotam uma “estratégia militar”, se espalhando rapidamente pelas plantações e causando grandes danos consumindo massa foliar (CAPINERA, 1999). Em plântulas, o inseto pode promover o tombamento das mesmas, devido ao fato de conseguir mastigar as estruturas responsáveis pela sustentação da planta. O estágio de lagarta dura 6 instares, com duração total de aproximadamente 15 dias (CAPINERA, 1999). As lagartas recém-eclodidas apresentam coloração clara nos primeiros instares, passando para uma coloração mais escura, próxima ao bege, à medida que se desenvolvem. A partir do terceiro instar, começam a aparecer listras brancas laterais. A carapaça da cabeça tem sempre uma coloração preta e é

comumente utilizada para saber em qual instar o inseto se encontra. No final do sexto instar, o inseto cai ao solo e pupa embaixo da terra. Os adultos resultantes da eclosão irão procurar parceiros nas proximidades, podendo percorrer distâncias consideravelmente grandes (SALVADOR, 2008). A oviposição acontecerá na superfície adaxial da folha, podendo ser na parte inferior, média ou superior da planta. A escolha da região da planta irá depender da idade de planta em questão (BESERRA et al., 2002). Cada fêmea irá colocar de 1500 a 2000 ovos, aproximadamente.



FIGURA 1.1: *S. frugiperda* nas fases de lagarta (esquerda) e adulto (direita) (adaptado de CAPINERA, 1999).

A. gemmatilis (Figura 1.3) é o principal inseto desfolhador de soja encontrado no Brasil, ajudando a compor o grupo de pragas responsável pela maioria das aplicações de inseticida no país (SALVADOR, 2008). Popularmente conhecida como “lagarta-da-soja”, o inseto se comporta como mede-palms nos primeiros estágios de vida, adotando uma coloração verde e estrias brancas. Nesse período também utiliza fios de seda para não cair no chão mediante algum estresse externo, denominado esse estágio de vida como “estágio de fio”. Mais velhas, a coloração passa a ser mais escura e as listras brancas são mantidas. As lagartas podem atingir até 40 mm de comprimento e são mais ativas, caindo no solo quando incomodadas. (SALVADOR, 2008; HOFFMANN-CAMPO et al., 2006). Após pupar no solo, a eclosão dos adultos gera mariposas de coloração próxima ao bege, sempre com uma linha transversal unindo as pontas do primeiro par de asas (SALVADOR, 2008). Após copularem, as fêmeas procuraram ovipositar na face abaxial das folhas, preferencialmente na parte da noite. Esse hábito faz com que as lagartas eclodam em um ambiente propício para sua alimentação e desenvolvimento e, quando somado ao grande número de ovos depositados por inseto (cerca de

1000 ovos), potencializa os danos causados. Cada geração dura aproximadamente um mês, sendo completadas de 4 a 6 gerações durante o ano agrícola.



FIGURA 1.2: *A. gemmatalis* larva (esquerda) e adulto (direita) (adaptado de HOFFMANN-CAMPO et al., 2012).

1.2 - Mecanismos de defesa das plantas

Plantas dependem de estratégias alternativas de defesa para lidar com insetos herbívoros, uma vez que não conseguem se mover para evitar a herbivoria (TREUTTER, 2006). Essas estratégias, tratadas aqui como mecanismos de defesa, podem ser classificadas de acordo com sua disponibilidade na planta, sendo constitutivas (sempre presentes nos tecidos) ou induzidas (sendo ativadas somente quando necessário) (MITHÖFER e BOLAND, 2012; PENTZOLD et al., 2013). Pragas ocasionais provavelmente exigem defesas induzidas, uma vez que a planta gastaria muita energia produzindo moléculas que só seriam utilizadas em determinado período. Por outro lado, para insetos que ocorrem o ano todo, seria mais interessante do ponto de vista energético a produção de defesas constitutivas.

As plantas podem se defender de insetos mastigadores através de estruturas presentes na superfície de suas folhas, denominadas tricomas. Essas estruturas dificultam a mastigação das folhas pelos insetos, além de conterem, em alguns casos, ceras deterrentes (LEVIN, 1973; KHAN et al., 1986). Plantas também conseguem se defender quimicamente, através da produção de metabólitos secundários, tóxicos para insetos. Esses metabólitos serão tratados como defesas químicas. Devido a grande variedade de estruturas e modos de ação dessas defesas químicas, plantas tem probabilidade de produzir efeitos sinérgicos que aumenta a toxicidade desses compostos, ajudando a planta a se defender de uma série de inimigos diferentes (JONES e FIRN, 1991; WITTSTOCK e GERSHENZON ,

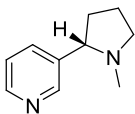
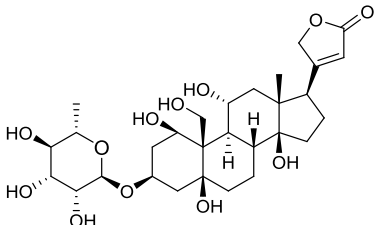
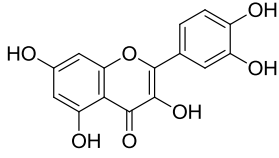
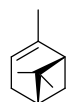
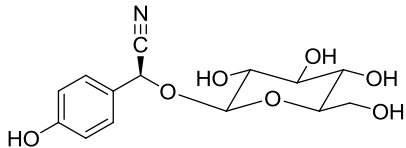
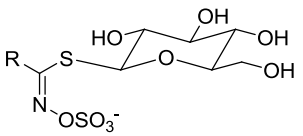
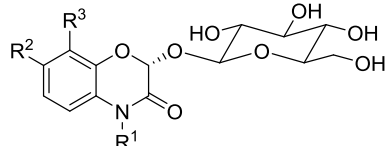
2002). Existem cerca de 200.000 metabólitos secundários de plantas, sendo alguns deles apresentados na Tabela 1.1 (PICHERSKY, 2011).

É importante salientar que as defesas químicas não estão restritas a pequenas moléculas orgânicas, existindo também plantas que produzem compostos inorgânicos (SiO_2 por exemplo) ou biomoléculas (como enzimas e peptídeos) (MITHÖFER e BOLAND, 2012; DANG e VAN DAMME, 2015). O óxido de silício teria a função de acelerar o desgaste mandibular em insetos herbívoros, por se comportar como um abrasivo, enquanto as biomoléculas teriam as mais variadas funções, tais como peptidases, oxidases promotoras de stress oxidativo e peptídeos inibidores de protease, por exemplo (FELTON et al., 1994; SHULKE e MURDOCK, 1983).

Plantas podem também se defender de herbívoros de maneira indireta. Mecanismos de indução envolvendo ácido jasmônico são conhecidos por resultarem na produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs, da sigla em inglês) específicos para atrair os inimigos naturais de lagartas (RAMACHANDRAN et al., 1991). Esses insetos são em sua grande maioria parasitoides de ovos de Lepidoptera (vespas do gênero *Telenomus*, por exemplo), fazendo com que a lagarta não ecloda devido à presença da larva de vespa (BUENO et al., 2014).

Além de depender das capacidades metabólicas e fisiológicas da planta, o tipo de defesa escolhida depende também do inseto envolvido na interação. Hábitos alimentares e possíveis elicitores secretados pelos insetos resultam em estímulos diferentes para a planta, influenciando seus mecanismos de defesa (HILKER e MEINERS, 2010; FELTON et al., 1994). O dano causado pela lagarta *Spodoptera exigua* em *Medicago truncatula* estimula, na planta, a produção de enzimas relacionadas à síntese de terpenóides, conhecidos por serem tóxicos para insetos herbívoros (BEDE et al., 2005). Danos mecânicos tentando simular o causado pelo inseto geram respostas diferentes, sugerindo que a presença que a secreção salivar do inseto tem papel fundamental na resposta da planta.

TABELA 1.1: Exemplos de defesas químicas de plantas (adaptado de MITHÖFER e BOLAND, 2012; NIEMEYER, 2009; DESPRÉS et al., 2007).

Defesas químicas	Estruturas representativas	Modos de ação
Alcaloides	 <p>nicotina</p>	Inibição de receptores neurais, deterrência.
Cardenolideos	 <p>ouabaina</p>	Inibição de Na ⁺ /K ⁺ -ATPases
Flavonoides e compostos fenólicos	 <p>quercetina</p>	Inibição enzimática, deterrência, dano por estresse oxidativo
Terpenoides	 <p>(-)-α-pineno</p>	Inibição de receptores neurais, deterrência.
Glicosídeos cianogênicos	 <p>durrina</p>	Inibição de citocromo oxidases mitocondriais acompanhado de liberação de CN ⁻
Glucosinolatos	 <p>(R = alquilsulfóxidos, alil, indol...)</p>	Reações com nucleófilos presentes no meio biológico, diminuição dos estoques de glutatona
Benzoxazinoides	 <p>(R¹, R², R³ = H, OH, OMe)</p>	Reações com nucleófilos presentes no meio biológico

Para se defender da toxicidade das moléculas que serão utilizadas como defesas químicas, as plantas geralmente reservam esses compostos em compartimentos celulares específicos, onde não difundiriam para locais onde causariam dano à planta. Defesas de dois componentes geralmente são armazenadas em lugares diferentes da célula, evitando sua ativação sem que dano mecânico da mastigação seja causado (PENTZOLD et al., 2013). Como exemplos dessas defesas, existem os glucosinolatos, armazenados em compartimentos celulares diferentes da mirosinase, enzima responsável pela clivagem do glicosídeo, gerando intermediários reativos a base de tio-isocianato (JESCHKE et al., 2016). Benzoxazinoides também seguem a mesma lógica (WOUTERS et al., 2016). Os glicosídeos seriam armazenados no vacúolo celular, enquanto as β -glucosidases estariam presentes nos cloroplastos. O dano causado através da mastigação rompe as membranas dessas organelas, possibilitando que os compostos como o DIMBOA (2,4-di-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) forme espécies eletrófilas que causam dano celular.

1.2.1 Flavonoides e isoflavonas como defesas químicas

Flavonoides e isoflavonas estão presentes em diferentes partes da soja e em concentrações variadas (PERLATI et al, 2016; GRAHAM, 1991; SOUZA, 2014; ROMANI et al., 2003). A essas moléculas são atribuídas várias funções, como regulação do stress oxidativo, participação em sinalizações hormonais e defesa química contra insetos (SIMMONDS, 2003; PIUBELLI et al., 2005).

Já foram reportadas alterações no intestino médio, redução na massa e prolongamento dos estágios de vida de *A. gemmatilis* mediante a ingestão de rutina e genisteína, via dieta artificial e com cultivares de soja contendo esses compostos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; PIUBELLI et al, 2005; SALVADOR, 2008). Alta atividade de células regenerativas e regiões do intestino médio com células apresentando características degenerativas indicam dano ocorrido, provavelmente, por estresse oxidativo (APPEL, 1994). A membrana peritrófica, provavelmente envolvida em processos de detoxificação de aleloquímicos (LEHANE, 1997), pode também sofrer alterações mediante a ingestão de flavonoide. Essa membrana é um tecido que envolve a parte interna do intestino de alguns insetos, sendo composta por lipídeos, além de outros compostos. A baixa concentração de lipídeos pode

influenciar na integridade da membrana, prejudicando sua função. Salvador encontrou menor concentração de lipídeos em pupas de *A. gemmatalis* que ingeriram dieta contendo rutina, assim como menor massa e crescimento mais lento. (SALVADOR, 2008). Apesar disso, as análises do intestino médio de *A. gemmatalis* realizadas por Salvador sugerem que o dano causado por rutina está mais relacionado a desestruturação de células do epitélio, principalmente as colunares. O dano da rutina foi potencializado pela adição de genisteína, sugerindo um efeito sinérgico para os dois compostos.

Rutina também foi tóxica para *S. frugiperda* quando incorporada em dietas artificiais. Foi observada a diminuição da massa do inseto para rutina e a prolongação dos estágios de vida para e rutina e astilbina (SILVA et al., 2017; PEREIRA et al., 2002). Larvas de *S. frugiperda* rejeitaram fortemente o material tratado com os compostos, sugerindo um efeito deterrente para esses flavonoides (NAPAL e PLACIOS, 2015). *S. frugiperda* também sofre prejuízos em relação a sua sobrevivência e duração do estágio de pré-pupa quando alimentada com dieta contendo quercetina, dentre outros fenólicos, provenientes de extratos de *Malpighia emarginata* (MARQUES et al., 2015). O extrato possuía ácido gálico, catequina, quercetina e derivados e ácido *p*-cumárico, sendo a catequina encontrada em maior quantidade, dentre os compostos citados.

Além da genisteína, outras isoflavonas afetam o desenvolvimento e o perfil de alimentação de alguns insetos mastigadores (SIMMONDS, 2003). *Helicoverpa armigera* sofre efeitos severos de maackiaina e judaicina, duas isoflavonas preniladas. O inseto se alimenta menos e transforma menos alimento em biomassa. maackiaina foi tóxica também para *S. frugiperda* e *S. exíqua*, sugerindo maior toxicidade para essa isoflavona em relação as testadas (judaicina-7-O-glicosídeo, 2-metoxi-judaicina, judaicina e maackiaina). As concentrações de daidzeína e genisteína aumentam quando *Nezara viridula* se alimenta de sementes de soja (PIUBELLI et al., 2003). Maiores concentrações de isoflavonas aparentaram gerar mais deterrência, uma vez que os adultos de *N. viridula* consumiam menos as sementes com mais isoflavonas. Sabe-se também dos efeitos sinérgicos apresentados por isoflavonas e flavonoides. A mistura de rutina e genisteína gerou efeitos tóxicos mais severos em *A. gemmatalis* (SALVADOR, 2008). Extratos

etanólicos de soja em que flavonoides e isoflavonas estavam presentes afetaram mais o crescimento de *Trichoplusia ni* (HOFFMAN-CAMPO et al., 2001).

Spodoptera litura sofre efeitos nocivos quando se alimenta de dieta contendo quercetina, demonstrado maior toxicidade para insetos mais jovens (SELIN-RANI et al., 2016). Com 6 ppm em dietas artificiais, foram obtidas mortalidades de aproximadamente 94, 92, 88 e 85% para o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto instar, respectivamente. O consumo e conversão de alimento em biomassa diminuí, gerando menores taxas de crescimento em todos os ínstaes. As células do intestino médio de *S. litura* alimentada com dieta contendo quercetina sofreram danos severos relacionados à integridade das células. Esse fato pode ser devido a formação de espécies reativas de oxigênio, catalisadas pela quercetina, que por sua vez poderiam inibir ou dificultar a absorção de nutrientes (BARBEHENN et al., 2005; BI e FELTON, 1995).

Os efeitos de quercetina em *Oedaleus asiaticus*, um gafanhoto conhecido por causar prejuízos em pastagens no norte da Ásia, foram avaliadas por Cui e colaboradores (CUI et al., 2019). No estudo, os autores identificaram a diminuição do nível de transcritos na cascata IGF-FOXO, envolvida nos equilíbrios relacionados à insulina que regulam diversas funções celulares, como crescimento, apoptose e a produção de enzimas referentes à atividade antioxidante. Concomitantemente, foi identificada maior atividade nas enzimas relacionadas à prevenção do estresse oxidativo, como oxidases (MFO), superóxido dismutases (SOD) e catalases (CAT). Esses resultados sugerem um aumento do stress oxidativo no inseto, assim como um desequilíbrio em seu metabolismo primário, através da inibição da produção de transcritos importantes para a regulação de suas funções primárias. Esses efeitos foram acompanhados também de redução no crescimento e sobrevivência dos insetos. Precedendo o trabalho de Cui, um estudo semelhante foi desenvolvido com a lagarta *T. ni* (AHMAD et al., 1987). Foi medida a atividade de enzimas referentes a redução do stress oxidativo (SOD, CAT, glutathiona peroxidase (GSHP) e glutathiona redutase (GR)) frente aos compostos pró-oxidantes quercetina e xantotoxina. Os resultados mostraram inibição da atividade das enzimas em questão frente a concentrações baixas dos dois compostos, observando um IC₅₀ de 0,0045% (m/m) para quercetina.

Para *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae), quercetina é o flavonoide mais tóxico dentre os estudados por Salunke e colaboradores (SALUNKE et al., 2005). O extrato de *Calotropis procera*, contendo uma mistura de flavonoides, demonstrou uma toxicidade maior que quercetina, sugerindo um efeito sinérgico para o modelo de inseto-flavonoide estudado. Os efeitos tóxicos observados durante o trabalho foram redução na oviposição, menor viabilidade de ovos e adultos com menores massas após eclosão.

Maiores concentrações dos flavonoides rutina, isoquercetina e hesperitina foram encontradas no genótipo de soja PI 227687, considerado resistente à insetos herbívoros, em comparação com o genótipo susceptível IGRA RA 626 RR (SOUZA, 2014). As isoflavonas daidzina e daidzeína também foram encontradas em maior quantidade no genótipo resistente. A rutina se destaca entre esses compostos, sendo encontrada em concentração 36 vezes maior que o segundo flavonoide mais abundante (isoquercetina) no genótipo resistente. Rutina também é majoritária no genótipo susceptível, no qual sua concentração é 11 vezes maior do que a da isoquercetina. O genótipo PI 227687 apresenta uma maior concentração de flavonoides nas folhas das partes inferiores da planta, sendo maior também no estágio vegetativo da planta. Outros estudos mostram que larvas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* crescem menos nas partes inferiores desse cultivar, abaixo do terceiro trifólio (SMITH e GILMAN, 1981), sugerindo uma possível relação entre concentração de flavonoides nas folhas e crescimento desses insetos. A grande concentração de rutina nesses tecidos pode sugerir também uma facilidade para esses insetos se alimentarem de tecidos que contém rutina, uma vez que rutina está presente em grandes concentrações nas partes da planta em que os insetos cresceram mais. Vale salientar também que o cultivar susceptível apresentou maior concentração de macronutrientes do que o cultivar resistente, sugerindo uma possível relação do crescimento de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* e a concentração de macronutrientes presente em cada cultivar.

Rutina também foi encontrada em maior concentração no trabalho desenvolvido por Perlati e colaboradores (PERLATI et al., 2016). Nas folhas dos cultivares de soja estudados, rutina foi o flavonoide mais abundante dentre os seis observados. Foram reportadas variações de até três ordens de magnitude na concentração de rutina, isoquercetina e hesperidina. Outros trabalhos encontraram

uma variedade maior de flavonoides em soja (ROMANI et al., 2003; SONG et al., 2014). Nos diferentes tecidos da planta estudados por Romani e colaboradores, foram encontrados principalmente derivados de quercetina e kaempferol. A maior quantidade de isoflavonas é encontrada nas raízes, sendo genisteína presente em maior concentração, enquanto as folhas mostraram a maior variedade de flavonoides e isoflavonoides. Esses fatos podem ser uma evidência do dinamismo da distribuição desses compostos em plantas de soja. Os cultivares utilizados nesse estudo foram Emiliana, Kure e Elvir, sendo o cultivar Emiliana o que possui maior concentração isoflavonas.

Ao contrário do observado nas folhas de plantas a partir da terceira folha (SOUZA, 2014; SONG et al., 2014), nas quais rutina é sempre o flavonol encontrado em maior concentração, os tecidos de plântulas tem uma quantidade maior de isoflavonas, variando entre conjugados de genisteína e daidzeína na maioria dos tecidos (GRAHAM, 1991). Nas folhas, as plântulas metabolizam mais flavonoides do que isoflavonas 3 dias após a germinação. No quinto dia após a germinação, glicosídeos de kaempferol, quercetina e metilquercetina já são predominantes em concentração.

Em resumo, flavonoides e isoflavonas afetam o crescimento e desenvolvimento de insetos herbívoros de diferentes maneiras. Há uma literatura maior para flavonoides, porém a importância das isoflavonas para a defesa da planta não pode ser descartada. Efeitos sinérgicos podem estar presentes, além de algumas isoflavonas isoladas também apresentarem toxicidade, como a genisteína. O dinamismo da variação desses compostos, juntamente com a observação da variação da toxicidade de acordo com o tipo de composto, pode ser uma evidência das diferentes estratégias utilizadas pela planta para se defender. As relações de flavonoides e isoflavonas com as taxas de consumo de alimento e crescimento pode sugerir que sua atividade está relacionada aos processos de digestão e absorção de nutrientes.

1.3 - Mecanismos de defesa dos insetos

Para conseguirem se alimentar de plantas com defesas químicas, insetos desenvolveram adaptações que os tornaram aptos a contornar os efeitos nocivos dos variados tipos de defesa de plantas (DESPRÉS et a., 2007; LI et al., 2007).

Assim como em plantas, essas adaptações podem ser constitutivas ou induzidas, sendo posteriormente classificadas em comportamentais, bioquímicas e moleculares (AGRAWAL et al., 2012).

O tipo de adaptação a ser empregado dependerá também da posição do inseto em um espectro especialista-generalista, definido de acordo com seus hábitos alimentares (DESPRÉS et al., 2007). Insetos especialistas se alimentam de poucas espécies de plantas, geralmente de gêneros e famílias próximas, enquanto generalistas são capazes de alimentar-se de uma ampla gama de plantas, geralmente de famílias distintas. Insetos especialistas estão expostos a quantidades altas de um determinado tipo de substância, por se alimentarem sempre da mesma planta. Dessa maneira, defesas constitutivas fariam mais sentido de serem produzidas. Por outro lado, insetos generalistas estão expostos a uma maior variedade de xenobióticos, sendo assim preferíveis adaptações induzidas (LI et al., 2007; PENTZOLD et al., 2013). É necessário salientar que, na natureza, a maioria dos insetos apresenta comportamento entre os dois extremos, sendo raros os casos de insetos pertencentes a um dos extremos do espectro.

Defesas comportamentais são entendidas como os diferentes hábitos que o inseto pode desenvolver para lidar com a toxicidade de determinado xenobiótico (DESPRÉS et al., 2007). Insetos podem evitar as toxinas presentes em plantas se alimentando de órgãos específicos que não contenham os compostos nocivos, como também se alimentar de estágios específicos da planta que não apresentem grandes quantidades de xenobióticos (NEALIS e NAULT, 2005). Insetos sugadores conseguem causar dano celular mínimo, devido à forma com que extraem os nutrientes da planta, utilizando seu estilete. A modificação e expressão diferencial de genes específicos para lidar com determinado composto pode ser entendido como uma adaptação molecular (AGRAWAL et al., 2012), como é o caso de lepidópteros tolerantes a cardenólídeos, que apresentam mutações pontuais em suas bombas de sódio-potássio, tornando-se insensíveis à inibição por esses xenobióticos. Adaptações bioquímicas são definidas como as estratégias metabólicas utilizadas pelo inseto para diminuir a toxicidade de determinado composto. São exemplos os mecanismos de glicosilação utilizados por lepidópteros para neutralizar o efeito de glicosídeos tóxicos, ocorrendo a funcionalização com uma glicose antes que possam

gerar produtos tóxicos para o inseto (PENTZOLD et al., 2013, WOUTERS et al., 2014).

O metabolismo de xenobióticos, entendido como uma adaptação bioquímica constitutiva ou induzida, pode ainda ser dividido em três etapas (Figura 1.1), sendo as reações presentes em cada fase semelhantes com o metabolismo de drogas em humanos (KENNEDY e TIERNEY, 2012). A Fase I compreende reações mais simples, como oxidações e esterificações, que aumentam a polaridade e reatividade do xenobiótico em questão. O aumento da polaridade resulta em menor difusão do composto, facilitando seu caminho até a Fase II onde a maior reatividade adquirida facilitará a funcionalização. As enzimas responsáveis por esse tipo de reação são oxidases, geralmente pertencentes à família das P450, e hidrolases, adicionado ou expondo grupos como hidroxila, amina e carboxila.

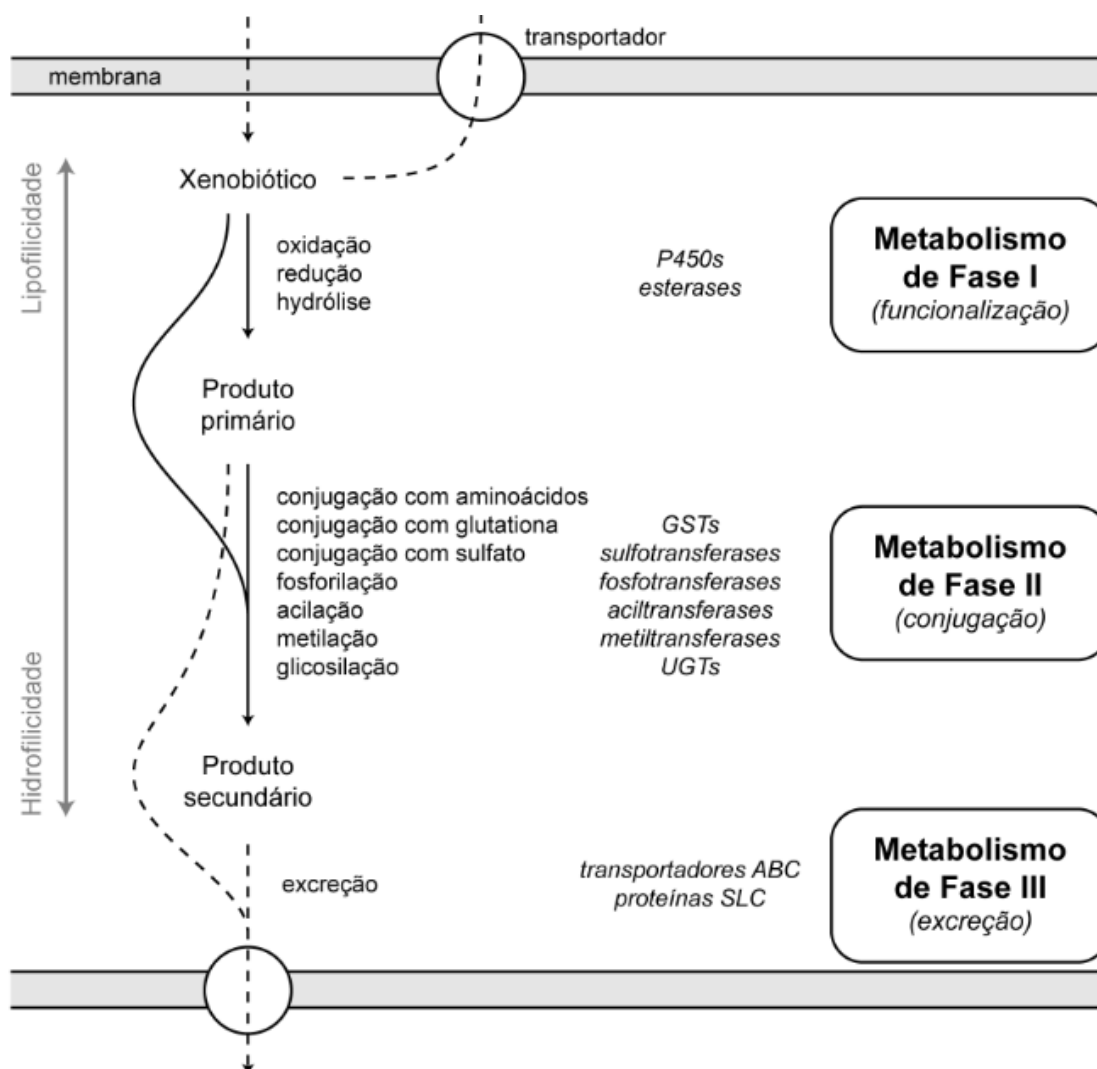


FIGURA 1.3: Fases do metabolismo de xenobióticos em insetos

As funcionalizações que acontecem na Fase II aumentam ainda mais a polaridade dos xenobióticos e são realizadas visando a diminuição da toxicidade. Benzoxazinoides são re-glucosilados no intestino médio de *S. frugiperda* para evitar que intermediários altamente nucleofílicos sejam formados e causem dano celular (WOUTERS et al, 2014). Essa funcionalização acontece de maneira estereoespecífica, para que as glicosidases presentes no intestino do inseto não voltem a clivar o glicosídeo e gerar espécies tóxicas novamente. Essa reação é catalisada por enzimas do tipo UDP-glicosiltransferase. Em insetos, essa família de enzima já foi estudada por Ahn e colaboradores, sendo conhecida a nível de domínios catalíticos, conservando sempre resíduos que revelam sua natureza intermembrana (AHN et al., 2012). Salicinoides também são glicosilados por *Lymatria dispar*, provavelmente com objetivo de diminuir a reatividade dos intermediários formados pela quebra espontânea dos salicinoides (BOECKLER et al., 2016).

Alguns desses glicosídeos são ainda fosforilados no açúcar, o que facilitaria sua excreção. Ambas as enzimas envolvidas nesses processos (UDP-glucosiltransferases e fosfotransferases) poderiam ser classificadas como pertencentes à Fase II do metabolismo de xenobióticos. Após passarem pela Fase II, os substratos funcionalizados e mais hidrofílicos são mais fáceis de serem excretados, tanto por transporte ativo quanto passivo (KENNEDY e TIERNEY, 2012; IOANNIDES, 2001).

A Fase III compreende a excreção dos xenobióticos, mediante transporte ativo ou passivo. As moléculas responsáveis pelo transporte ativo são proteínas transportadoras de soluto (SLC do inglês) e os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), um grupo proteico que utiliza ATP para transportar moléculas através da membrana (JONES e JORGE, 2004).

1.4 – Relação estrutura – propriedade anti/pró-oxidante de flavonoides

Flavonoides são conhecidos principalmente por suas propriedades antioxidantes em sistemas biológicos (PROCHAZKOVA et al., 2011; GRZEGORZEWSKI, 2010; AMIC et al., 2007). Tais propriedades podem ser explicadas pelo fato dos flavonoides apresentarem anéis aromáticos conjugados, juntamente com grupos carbonila e hidroxila. A deslocalização eletrônica promovida pelo alto nível de conjugação possibilitado por tais funções resulta na estabilização de radicais adquiridos. A Figura 4 apresenta um exemplo de flavonoide com os principais sítios responsáveis por essa interação destacados, sumarizados e explicados pelos três critérios de Bors (BORS et al., 1990) para que flavonoides sejam antioxidantes. São eles:

- A presença de um *orto*-catecol no anel B (Figura 1.4(2)), que fornece estabilidade para o radical fenoxil derivado de flavonoides (FI-O[•]), através da deslocalização eletrônica ou ligação de hidrogênio. O radical FI-O[•] formado também pode ser estabilizado pela perda de mais um elétron e consequente formação de uma *orto*-quinona, possível devido ao padrão de substituição das hidroxilas (Figura 1.5).

- A insaturação presente entre C2 e C3 juntamente com a cetona na posição 4 (Figura 1.4 (3)). Além de possibilitarem a deslocalização eletrônica por toda molécula, o sistema destacado ainda consegue estabilizar um radical através da conjugação entre seus componentes (Figura 1.6)
- Presença de hidroxilas nas posições 3 e 5 (Figura 1.4 (4)), que conseguem estabilizar o radical através de ligações de hidrogênio, semelhante ao visto ao visto na Figura 1.6 C.

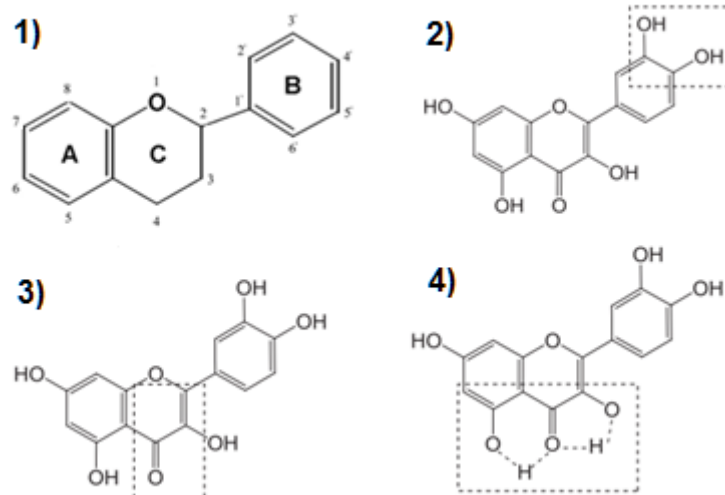


FIGURA 1.4: Estrutura geral de flavonóis (1) e principais sítios da quercetina capazes de estabilizar um radical (2,3 e 4) (adaptado de PROCHAZKOVA et al., 2011).

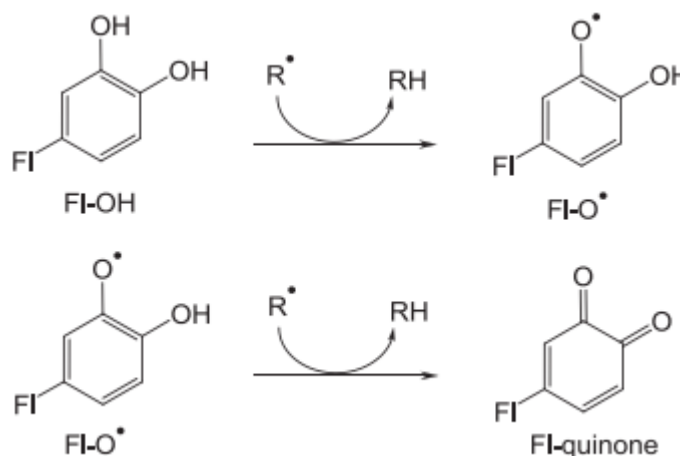


FIGURA 1.5: Mecanismo de estabilização radicalar via ortoquinona (adaptado de PROCHAZKOVA et al., 2011)

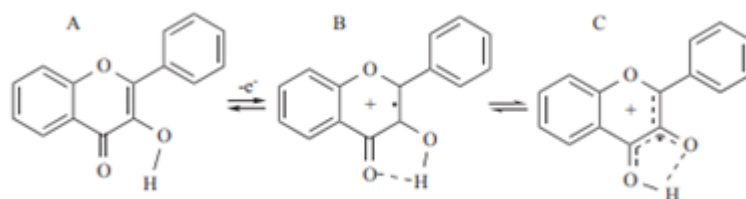


FIGURA 1.6: Mecanismo de estabilização do radical pelas funções presentes no anel C (adaptado de AMIC et al., 2007).

Suas propriedades relacionadas a radicais livres dependem fortemente do padrão de substituição dos anéis. Além do observado nos critérios de Bors, pode-se dizer que o padrão de substituição do anel A tem pouca influência nas propriedades antioxidantes, enquanto o do anel B as influencia fortemente. A presença de hidroxilas livres é necessária para que o composto tenha atividade, enquanto a substituição dessas hidroxilas por outras funções, como metoxila, ou a remoção das mesmas, acarreta em diminuições na atividade, pelo impedimento da formação de uma estrutura quinônica pelos radicais FI-O• (PROCHAZKOVA et al., 2011; GRZEGORZEWSKI, 2010; AMIC et al., 2007; BORS et al., 1990). O padrão de substituição dessas hidroxilas também faz diferença, uma vez que contribui para uma deslocalização eletrônica específica, que leva à estabilização da espécie radicalar. Em geral, o padrão que gera mais atividade é 3',4'-di-hidroxi, uma vez que essa estrutura lembra um *orto*-catecol, que tem capacidade de gerar uma quinona estável.

Substituições no anel C também podem influenciar as propriedades antioxidantes dos compostos. Se houver uma hidroxila presente na posição 3, a conjugação entre ligação dupla C2-C3, a cetona em 4 e a hidroxila em 3, pode resultar na estabilização de um radical, como mostrado acima (Figura 1.6) (AMIC, 2007). Conforme o observado em pares aglicona-glicosídeo (quercetina-rutina, hesperetina–hesperidina, baicaleína–baicalina, e quercetina–quercetrina) O poder de supressão de radicais superóxidos diminui bastante com a presença de um açúcar na molécula, principalmente para substituições na posição 3 (RICE-EVANS et al., 1996; AMIC e LUCIC, 2010; SUN et al., 2010; FIRUZI et al., 2004). Funcionalizações com grupos mais volumosos em C3 resultam em pequenas torções no anel C, gerando conjugações menos efetivas entre esse anel e o resto da molécula, além de impedir que a ligação de hidrogênio seja formada pelo hidrogênio da posição 3. A tabela 2 ilustra a relação do ângulo de torção e a substituição com diferentes radicais.

TABELA 1.2: Ângulos de torção de diferentes flavonoides de acordo com a substituição na posição 3 (adaptado de GRZEGORZEWSKI, 2010).

Flavonoide	Ângulo de torção da Molécula (°)	Ângulo de torção do Radical (°)
Quercetina	-0,29	-0,19
Luteonin	16,29	0,04
Catequina	35,64	39,19
Apiegeina	16,48	-0,05
Kampefereol	-0,14	0,00
Taxofolina	-27,64	-37,53
3-O-Me-quecertina	-23,58	0,04
Hesperitina	-42,28	-41,74
Naringenina	-42,73	-41,34
Rutina	27,17	nd

Substituições nas posições do anel A podem alterar a solubilidade dos flavonoides, assim como interferir no seu transporte ativo através de membranas (SPENCER et al., 2003). Esses fatores irão influenciar na biodisponibilidade dos compostos, possivelmente alterando as regiões no meio biológico que o flavonoide pode estar e, conseqüentemente, sua eficiência como antioxidante. É necessário

salientar que substituições nos outros anéis também podem influenciar em tais propriedades.

Os padrões de funcionalização também alteram as propriedades relativas à complexação de flavonoides com íons metálicos. Tais íons podem ser cofatores ou partes importantes de enzimas presentes no meio biológico. Essas enzimas teriam sua atividade comprometida mediante a complexação dos flavonoides com esses metais. Porém, essa propriedade dos flavonoides também pode ser benéfica para o sistema biológico em questão, uma vez que muitos íons, como ferro e cobre (II), estão envolvidos nos mecanismos de geração e propagação de ROS (espécies reativas de oxigênio, do inglês) e NRS (espécies reativas de nitrogênio, do inglês) (PROCHAZKOVA et al., 2011), atuando como catalisadores e propagadores dessas reações. Para que haja uma complexação efetiva, é necessário que os flavonoides tenham pares de elétrons livres, de preferência em posições adjacentes. Os principais sítios preferidos para complexação são apresentados na Figura 1.7. Qualquer padrão de substituição que impeça que alguma das hidroxilas adjacentes tenha seus pares de elétrons compartilhados com o metal, irá diminuir a eficiência e até impossibilitar a complexação. Porém, ainda existem muitas controvérsias e lacunas no conhecimento no que diz respeito às preferências de complexação de flavonoides com metais de transição (GRZEGORZEWSKI, 2010).

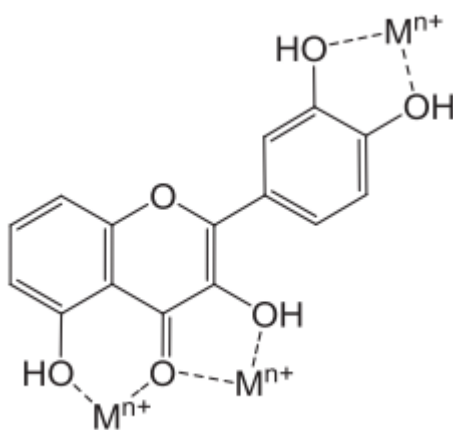


FIGURA 1.7: Principais sítios para a complexação com metais de transição (adaptado de PROCHAZKOVA et al., 2011).

As propriedades pró-oxidantes de flavonoides são observadas em vários sistemas (PROCHAZKOVA et al., 2011), podendo acontecer por vários mecanismos diferentes. De uma maneira geral, essa atividade é atribuída à reatividade do radical

fenoxil formado após a reação do flavonoide com radicais no meio biológico. Esse intermediário tem um tempo de vida bastante curto, podendo se oxidar para outras espécies, como também formar uma quinona mais estável. Essa reação seria responsável pela produção de ROS, como o superóxido (Figura 1.8). Os radicais fenoxil derivados de flavonoides também podem oxidar moléculas abundantes no meio biológico, como NADH. Esse tipo de oxidação, além de afetar os equilíbrios envolvendo NADH, resulta na grande formação de $O_2^{\cdot-}$. Apigenina, naringina e naringenina são exemplos de moléculas que se comportam dessa maneira (GALATI et al., 1999; GALATI et al., 2002, CHAN et al., 1999). A quinona formada também apresenta reatividade semelhante, podendo ser neutralizada por conjugações com nucleófilos, como a glutatona. Nota-se que essas propriedades são observadas devido à presença de uma *orto*-di-fenol no anel B, precursor das estruturas mencionadas.

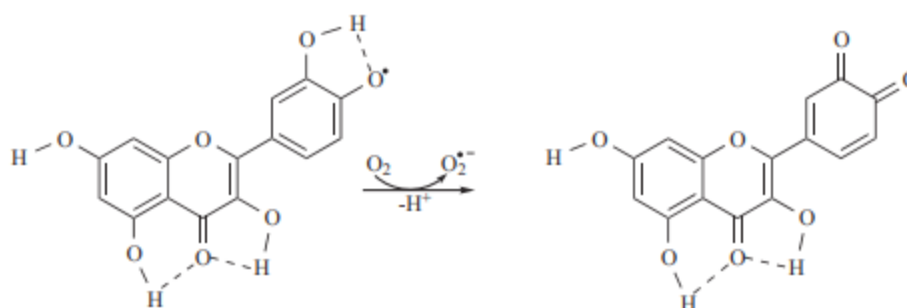


FIGURA 1.8: Atividade pró-oxidante dos flavonoides (adaptado de PROCHAZKOVA et al., 2011).

A literatura mostra que as propriedades pró-oxidantes dos flavonoides são, em muitos casos, dose-dependentes (PROCHAZKOVA et al., 2011). A concentração de H_2O_2 em linfócitos foi influenciada pela adição de quercetina e morina nas concentrações de aproximadamente 25-200 μM , enquanto não houve alterações para outras concentrações inferiores e outros flavonóis, como hesperetina e naringenina, segundo (YEN et al., 2003). Porém, os quatro flavonoides mostraram aumento na concentração de produtos provenientes da oxidação de lipídeos e foram capazes de induzir a quebra da fita dupla do DNA de uma maneira dose-dependente. No mesmo trabalho, observa-se também que a estrutura do composto influencia no aumento da concentração de radicais: quercetina fornece o maior aumento, enquanto naringenina e hesperetina fornecem os menores, sugerindo que os maiores efeitos estão relacionados com presença da ligação dupla entre o C2-C3

(YEN et al., 2003). Essa relação pode ser observada também em microsossomos de rato, onde gossipol, quercetina e miricetina aumentaram a oxidação de lipídios em baixas concentrações e aumentaram oito vezes a produção de radicais superóxido (LAUGHTON et al., 1988). Quercetina a 100 μM é tóxica também para o DNA de leucócitos humanos (WILMDS, 2008), enquanto fornece efeitos protetores em concentrações de 1 a 50 μM . Além da relação entre dose e propriedade, essas observações sugerem a importância das duas hidroxilas no anel B. Yoshiro e colaboradores (YOSHIRO et al., 1999) estudaram as propriedades pró-oxidantes de diferentes flavonoides frente ao DNA na presença de cobre (II). O estudo revelou que a presença de catecol na molécula é importante para a atividade oxidativa da molécula. Quercetina e miricetina apresentaram maior atividade, enquanto, kaempferol teve um desempenho inferior. Luteolina, apesar de ter um catecol na molécula, também apresentou baixa atividade, o que sugere a importância de uma hidroxila na posição 3 para que o flavonoide tenha atividade no sistema descrito no estudo.

A complexação dos flavonoides com metais também pode resultar em efeitos pró-oxidativos. Além do trabalho já comentado de Yoshino, El Amrani e colaboradores (EL AMRANIM et al., 2006) estudaram complexos de ferro (III) e flavonoides. Esses complexos seriam capazes de realizar a quebra do DNA, através da geração de um radical a partir da redução do ferro e oxidação do flavonoide. Possivelmente, ocorre a oxidação do catecol por cobre (II) ligado ao DNA, o que causa dano em sítios específicos do DNA.

1.5 – Outras relações ecológicas envolvendo flavonoides e isoflavonas

Flavonoides e isoflavonas estão relacionados aos hábitos de insetos herbívoros de várias maneiras. Existem casos em que podem atuar como estimulantes de herbivoria e em outros, como deterrentes. Vários trabalhos reportam rotina como fagoestimulante para insetos, tais como *Schistocerca albolineata* (Thomas), *Melanoplus differentialis* (Thomas) e *Schistocerca americana* (BERNAYS e CHAPMAN, 2000). Lepidópteros como *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua* e *Spodoptera exempta* respondem diferentemente a rotina dependendo da concentração. Em concentrações até 10 μM

a rutina é estimulante, mas acima dessa concentração passa a ser deterrente (SIMMONDS, 2003). Isoflavonas podem produzir efeitos sinérgicos com flavonoides. Rutina em combinação com genisteína e outros polifenóis prejudica a nutrição de *T. ni* (HOFFMAN-CAMPO et al., 2001). O inseto acumula menos biomassa quando se alimenta de dietas com rutina em sua composição. Os efeitos mais severos foram observados nos tratamentos com dietas contendo extrato etanólico de folhas de soja. A fração que apresentou mais toxicidade foi a que continha rutina e genisteína.

Isoflavonas também aparecem em relações microrganismos-planta. Tecidos da soja infectados com o patógeno *Phytophthora megasperma* apresentam grande quantidade de glicosídeos de genisteína e daidzeína (GRAHAM et al., 1990). Durante a infecção, esses glicosídeos são rapidamente hidrolisados, gerando um pico na concentração de isoflavonas, seguido por uma acumulação de gliceolinas, uma família de pterocarpanos que compartilha intermediários biosintéticos com flavonóis, conhecida por estar envolvida nesse tipo de relação microrganismo-planta. Isoflavonas também estão presentes em relações benéficas com microrganismos. Já foi reportada indução do gene responsável pela nodulação em *Bradyrhizobium japonicum*, uma importante bactéria que auxilia a planta na fixação de nutrientes (SUBRAMANIAN et al., 2006). *B. japonicum* também consegue induzir enzimas chave na biossíntese de isoflavonas, sugerindo uma relação com características mutualísticas entre planta e microrganismo mediada por isoflavonas.

Insetos podem utilizar os flavonoides presentes da planta em seu benefício, sequestrando e armazenando determinados flavonoides em seus tecidos enquanto adulto para as mais variadas funções. Mecanismos de sequestro foram observados na borboleta *Polyommatus icarus*, especialmente nas fêmeas. Os insetos sequestram prioritariamente os derivados não muito polares de quercetina e kaempferol, enquanto os açúcares mais polares são facilmente excretados (BURGHARDT et al., 2000; BURGHARDT et al., 2001). Isoflavonas e outras estruturas de flavonóis também são deixadas de lado. Os autores sugerem que esses compostos são sequestrados para serem utilizados na comunicação visual entre machos e fêmeas, uma vez que a fêmeas sequestram mais compostos que os machos. O bicho-da-seda, *Bombyx mori*, também sequestra quercetina para utilizar em seus casulos, provavelmente para proteção contra raios UV (HIRAYAMA et al., 2008). O inseto promove a glucosilação da quercetina, preferencialmente na posição

5, gerando um metabólito não encontrado nas plantas que *B. mori* consome. São observados também di e tri-glicosídeos nos casulos (HIRAYAMA et al., 2008; TAMURA et al., 2002).

Flavonoides podem influenciar também na oviposição em insetos, ajudando no reconhecimento da planta hospedeira. Insetos podem utilizar suas estruturas neurais em conjunto com as antenas e receptores presentes nas pernas para identificar os compostos presentes na superfície das plantas (SIMMONDS, 2001). *Papilio polyxenes* tem como seu estimulante de oviposição luteolina 7-O-(6-O-malonil)- β -D-glicosídeos (LMG), enquanto *Papilio xuthus* evita ovipositar em plantas que contenham quercetina 3-O-(2- β -D-xilo-piranosil-rutinosídeo) (FEENY et al., 1988). Flavonoides são utilizados também por algumas plantas para atrair polinizadores, seja através da coloração ou por algum sinal químico (TREUTTER, 2006). Wilbert e colaboradores relacionaram a diferença na polinização de duas plantas do mesmo gênero com a concentração de antocianinas em cada uma delas (WILBERT et al., 1978). A planta que continha em suas pétalas a maior concentração de antocianinas era mais visitada. Também em benefício de plantas, flavonoides podem ser exudados pelas raízes, induzindo a produção de proteínas relacionadas a infecção em bactérias simbiotes (TREUTTER, 2006).

Nota-se o quão complexas são as relações naturais que envolvem flavonoides, principalmente no que se diz respeito às nuances entre toxicidade e efeitos benéficos. Sabe-se ainda menos sobre o envolvimento dessas relações com o status de praga de lepidópteros pragas de soja. Além de possibilitar o desenvolvimento de novos mecanismos de controle, o entendimento dessas relações pode ajudar a elucidar possíveis mecanismos de resistência a inseticidas, contribuindo assim para o desenvolvimento de inseticidas mais eficazes e corretos ecologicamente (DESPRÉS et al., 2007).

2 – Objetivos

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho se propõe a analisar a toxicidade de dois flavonoides (quercetina e rutina) e uma isoflavona (naringenina) frente a insetos herbívoros mastigadores, assim como as possíveis estratégias metabólicas que esses insetos utilizam para lidar com esses compostos.

Representando exemplos de insetos herbívoros, foram escolhidos *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

Através da análise entre a toxicidade e o metabolismo dos flavonoides pelos insetos, buscam-se também informações que ajudem a explicar o seu status de praga agrícola, assim como a escolha da planta de soja como alimento.

Nesse contexto, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a toxicidade de quercetina e rutina frente a lagartas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* quando adicionadas a dietas artificiais em diferentes concentrações;
- Analisar o perfil químico das fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* após a ingestão de quercetina, rutina e naringenina a fim de detectar produtos do metabolismo desses compostos pelo inseto, buscando relações entre estrutura e toxicidade do flavonoide.
- Confirmar as atividades enzimáticas de UDP-glicosiltransferases propostas através de ensaios *in vitro* com tecidos dos insetos na presença de quercetina e rutina.

3 - Procedimento Experimental

Todos os solventes utilizados nesse trabalho eram de grau HPLC. Foram utilizados acetonitrila e metanol da marca CHROMASOLV™ (Honeywell - Riedel-de Haen) e DMSO da marca Hybri-Max™. Água deionizada foi utilizada no preparo de amostra. Para os experimentos de LC-MS, foi utilizada água de grau MS, da marca LiChrosolv®. Os flavonoides utilizados no preparo das dietas artificiais eram todos da marca Sigma Aldrich (San Louis, USA).

3.1 - Criação de insetos

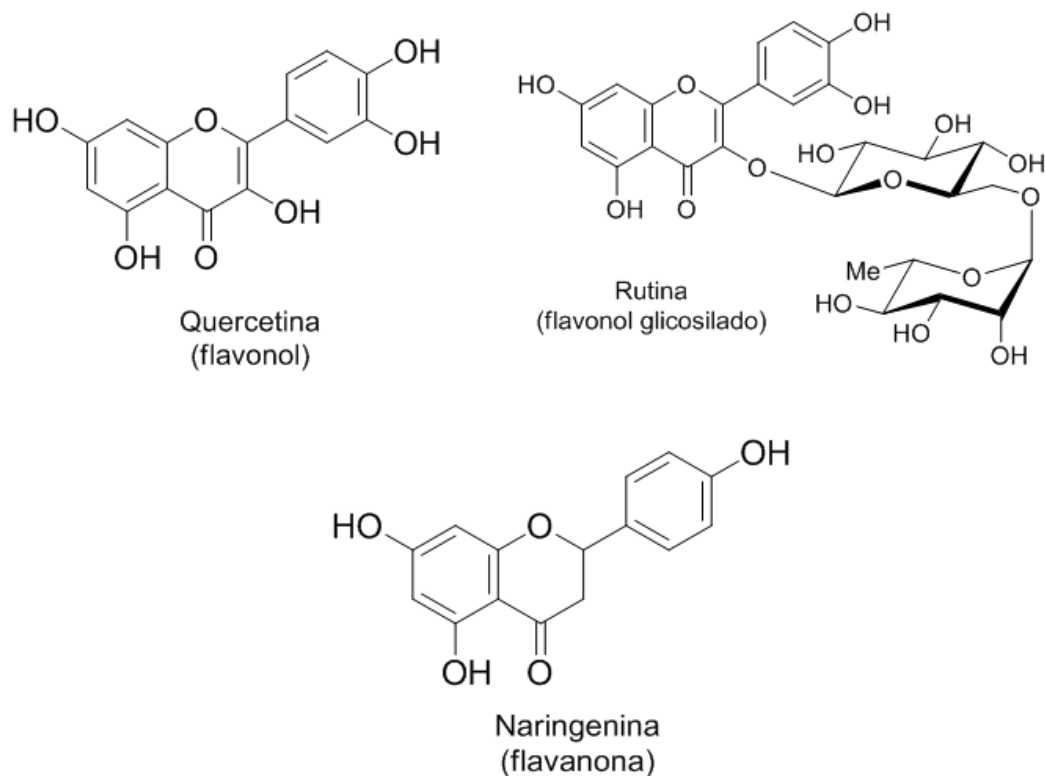
Os insetos foram obtidos na forma de ovos, como doação da Profa. Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno do Departamento de Proteção Vegetal da UNESP de Botucatu. Após a eclosão, as lagartas foram mantidas em dietas apropriadas até que atingissem uma massa de 30-50 mg no terceiro instar. *S. frugiperda* foi mantida em uma dieta mínima à base de farinha de feijão branco (JESCHKE et al., 2016) e *A. gemmatalis* em uma dieta proteica (BUENO et al., 2014). A dieta foi trocada

semanalmente e os potes eram limpos no mesmo período. Os ingredientes foram adquiridos em mercados locais. As lagartas foram mantidas em câmara incubadora tipo BOD a 25°C e 70% de umidade, utilizando um fotoperíodo de 12 horas.

3.2 – Bioensaios

Os insetos foram individualizados em potes plásticos redondos de 100 mL e separados em grupos para a realização dos bioensaios (N = 13-14 por tratamento). Cada indivíduo recebeu um cubo de dieta correspondente ao seu tratamento, o qual era trocado aproximadamente a cada 4 dias. Os bioensaios para ambas as espécies foram realizados utilizando dieta mínima. Flavonoides foram incorporados na dieta em concentrações de 1, 3 e 8 μmol por grama de dieta, tomando como base o que é encontrado em folhas de soja (PERLATI et al., 2016; GAZZONI et al., 1997). Os flavonoides foram dissolvidos em 2 mL de DMSO por 100 g de dieta e incorporados à dieta no final de sua preparação. Ao grupo controle foram adicionados 2 mL de DMSO puro por 100 g de dieta.

Os flavonoides escolhidos foram quercetina e rutina, representando flavonoides aglicona e glicosilados, respectivamente. Nas mesmas condições, também foram criados insetos com dietas contendo 8 μmol de naringenina, representando a classe das flavononas. As estruturas desses compostos estão apresentadas no Esquema 3.1.



ESQUEMA 3.1: Estrutura dos flavonóis utilizados nos bioensaios.

A massa das lagartas foi monitorada de dois em dois dias. Foram medidas também a sobrevivência e a duração dos estágios de larva e pupa de cada inseto, exceto para os tratamentos com naringenina. As fezes dos insetos submetidos a todos os tratamentos foram coletadas semanalmente para posteriores análises cromatográficas.

3.3 - Análise de Dados

As diferenças entre os tratamentos foram comparadas por testes estatísticos. Assumiu-se que as populações são suficientemente grandes para que a ANOVA pudesse ser realizada. As comparações entre os grupos foram realizadas através do teste t de Maior Diferença Significativa (HSD), para os dados de crescimento e de Menor Diferença significativa (LSD) para os dados de durabilidade dos estágios de vida. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistix 9 (Analytical Software).

Foi utilizada a Taxa de Crescimento Relativo (RGR) (JESCHKE et al., 2016) no tratamento dos dados de crescimento, sendo calculada para cada indivíduo que

sobreviveu até a data anterior à primeira lagarta pupar. O RGR foi calculado segundo a Equação 1.

$$RGR = \frac{\text{Massa larval ganha}}{\text{Média das massa x dias}} \quad \text{Eq. 1}$$

Para a análise dos dados de durabilidade dos estágios de vida, foi utilizada a média de cada grupo e amplitude do intervalo analisado. A média fornece uma noção do valor da concentração dos dados do intervalo analisado, enquanto a amplitude mostra o valor mínimo e máximo do mesmo intervalo.

3.4 - Extração e Preparo de Amostra

Os extratos de fezes foram preparados com 50 mg de fezes liofilizadas. A essa quantidade, foi adicionado 1 mL de H₂O/MeOH 10:90 (v/v) em um microtubo de 2 mL. O microtubo contendo as fezes e o solvente foi levado ao banho seco, onde permaneceu por 1 hora, a 25 °C e 1000 rpm. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4 °C, 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e evaporado por fluxo de N₂, e a amostra submetida a fracionamento por extração em fase sólida (SPE).

O cartucho de SPE utilizado foi de 1 mL, contendo 100 mg de sílica C₁₈ (CHROMABOND C18ec). Para ativar o cartucho, utilizou-se 4 vezes o volume morto de MeOH seguido por H₂O/MeOH 95:5. Após evaporação na capela, a amostra foi ressuspensa em H₂O/MeOH 95:5 e injetada na concentração máxima de 10 mg/mL, respeitando a capacidade de carga do cartucho. Realizou-se o *clean up* com H₂O/MeOH 95:5, na quantidade de 2 vezes o volume morto. A eluição foi realizada com 2 vezes o volume morto de H₂O/MeOH 70:30 e H₂O/MeOH 10:90. Cada fração foi evaporada na capela e ressuspensa em H₂O/MeOH 10:90 para as análises por LC-MS/MS.

3.5 - Ensaio Enzimático

Larvas de 3^o a 4^o instar foram anestesiadas em congelador por 5 minutos e dissecadas em tampão fosfato (pH 7,0, 10 mM) gelado. O intestino foi coletado, esvaziado e lavado no tampão, e transferido para microtubos contendo tampão fosfato (pH 7,0, 100 mM). Para cada tratamento (lagartas em dietas contendo

flavonoides e controle), 3 intestinos foram homogeneizados em 300 μL de tampão fosfato (pH 7,0, 100 mM) com um micropistilo.

Os ensaios foram realizados utilizando-se 2 μL de flavonoide a 25 mM (em DMSO, para concentração final de 1 μM), 20 μL de preparado enzimático, 4 μL de UDP-glicose a 25 mM (em água, para concentração final de 2 μM) e 24 μL de tampão fosfato (pH 7,0, 100 mM), completando um volume total de 50 μL . Os tubos foram incubados em banho seco a 25°C, 100 rpm por 1 hora, e a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μL de MeOH. Os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes foram diluídos em 900 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 10:90 para análise por LC-MS/MS.

Controles negativos dos ensaios foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, porém utilizando preparados enzimáticos fervidos em banho seco a 100°C por 15 minutos.

3.6 - Análises cromatográficas e espectrométricas

Os espectros de massas foram obtidos utilizando um Agilent 6545 Q-ToF LC/MS. O equipamento consiste em um analisador do tipo *Time of Flight* (Tempo de voo, do inglês) em *tandem* com um triplo quadrupolo. O analisador é acoplado com um sistema UPLC Agilent 1260 Infinity II. Para as separações aqui mencionadas, foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1x50 mm, 1,8 μm), na temperatura de 35°C. O gradiente utilizado consistia em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. As proporções de solvente A:B utilizadas foram de 95:5 do início até 1 minuto. Em 6 minutos, a proporção foi de 75:25, passando para 40:60 em 9 minutos. De 9,10 até 12 minutos foi utilizado 0:100 para a limpeza, seguindo de 95:5 de 12,1 até 15 minutos para que a coluna fosse condicionada novamente. Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL/min durante toda a corrida.

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Bioensaios com *S. frugiperda*

Nos experimentos aqui descritos, foram utilizados 2 mL de DMSO como solvente para incorporação dos flavonoides por 100g de dieta. Experimentos com 5 mL de etanol (o solvente mais largamente utilizado para esse tipo de experimento) resultou em mortalidade muito alta do grupo controle e baixa solubilidade dos flavonoides.

Os dados mostrados na Tabela 4.3 indicam toxicidade para rutina e quercetina em relação à duração dos estágios de lagarta e sobrevivência das pupas, sendo a quercetina mais tóxica que a rutina em concentrações menores, em acordo com o observado para outras lagartas (ELLIGER, 1980; HOFFMAN-CAMPO, 2006). Utilizando regressões lineares, observa-se uma tendência linear de prolongação do estágio de lagarta com o aumento da concentração de rutina e quercetina. Não foram observadas diferenças estatísticas para a duração do estágio de pupa devido ao baixo número de indivíduos de alguns grupos, o que diminui muito o poder do teste (MAGALHÃES e LIMA, 2015).

TABELA 4.3: Performance das lagartas de *S. frugiperda* submetidas a concentrações de rutina e quercetina. Médias com letras iguais associadas não apresentaram diferença significativa pelo teste t (LSD) com 95% de confiabilidade.

Tratamento	N	Sobrevivência (%)		Durabilidade (dias)		Amplitude	
		Lagarta	Pupa	Lagarta	Pupa	Lagarta	Pupa
Controle	13	100	87	9,69 ± 0,44 ^d	13,20 ± 1,04	(8-12)	(9-14)
Quercetina 1 µmol/g	13	100	87	9,85 ± 0,36 ^{cd}	12,78 ± 0,46	(8-12)	(11-14)
Quercetina 3 µmol/g	13	92	82	11,55 ± 0,74 ^{bc}	12,33 ± 0,44	(10-19)	(11-14)
Quercetina 8 µmol/g	13	100	33	14,00 ± 1,2 ^a	14,25 ± 0,14	(8-19)	(14-15)
Rutina 1 µmol/g	13	85	80	10,36 ± 0,33 ^{cd}	12,00 ± 0,39	(8-12)	(11-14)
Rutina 3 µmol/g	13	100	54	10,92 ± 0,37 ^{bcd}	13,43 ± 0,31	(8-12)	(11-14)
Rutina 8 µmol/g	13	100	77	12,62 ± 0,50 ^{ab}	11,90 ± 0,67	(10-15)	(8-14)

Comparando os tratamentos com o grupo controle, a Figura 4.9 mostra um crescimento 8,5% menor dos insetos para os tratamentos de quercetina 8 µmol/g e 6,5% para os tratados com rutina 8 µmol/g. Dentre os grupos de quercetina, o tratamento de 8 µmol/g também causa diminuição do crescimento em relação ao

tratamento de 1 $\mu\text{mol/g}$ (10,6%). O grupo rutina 8 $\mu\text{mol/g}$ tem a mesma relação com rutina 1 $\mu\text{mol/g}$ (7,4%).

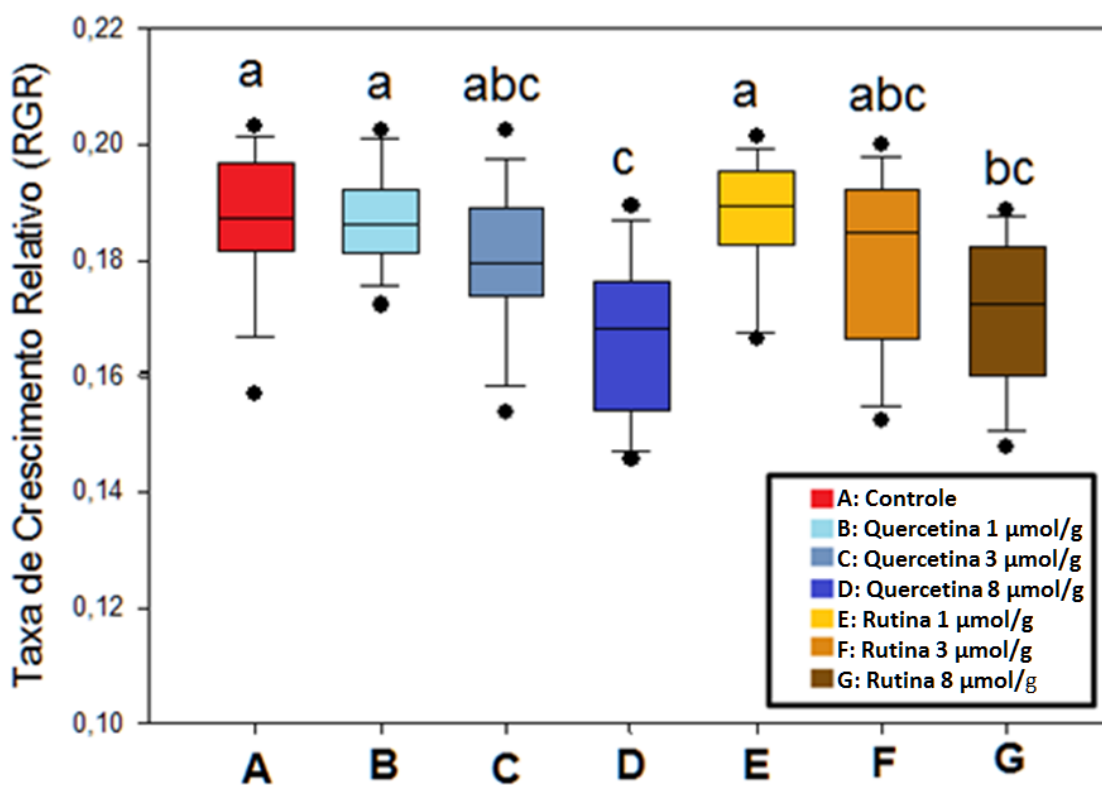


FIGURA 4.9: Taxa de crescimento relativo de *S. frugiperda* se alimentando de dietas com concentrações diferentes de flavonoides (N=13). Blocos identificados com as mesmas letras não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tuckey (HSD) com 95% de confiabilidade.

Regressões lineares para as médias de RGR do experimento indicam que a toxicidade de quercetina segue uma tendência linear dependente da dose ($p = 0,015$), enquanto os tratamentos de rutina não obedecem a essa ordem ($p = 0,06$), tomando-se um intervalo de confiança de 95%. Resultados da literatura (SILVA et al., 2017) mostram um comportamento linear para uma faixa de concentrações semelhantes de rutina. A quercetina não foi testada no trabalho citado.

Dados da literatura (HOFFMAN-CAMPO et al., 2006; NAPAL e PALACIOS) sugerem que as observações acima podem ser atribuídas ao fato de flavonoides causarem dano biológico através do estresse oxidativo, da precipitação de proteínas, da inibição enzimática e da deterrência. A aglicona quercetina seria mais tóxica devido a sua maior permeabilidade em membranas celulares (SPENCER et al., 2003).

4.2 - Bioensaios com *A. gemmatalis*

Lagartas de *A. gemmatalis* foram criadas com uma dieta proteica, diferentemente de *S. frugiperda*. Porém, experimentos preliminares de quantificação de flavonoides nessa dieta proteica mostraram níveis de recuperação muito baixos (4%), revelando que a dieta proteica não seria apropriada para bioensaios com flavonoides. Dessa maneira, para os bioensaios com *A. gemmatalis*, utilizou-se a dieta mínima, a mesma dos experimentos de *S. frugiperda*, que mostrou recuperações aceitáveis (~70%).

Os resultados de sobrevivência (Tabela 4.4) mostram uma mortalidade maior que o controle para todos os tratamentos, sendo os grupos que se alimentaram de rutina os mais prejudicados. A alta mortalidade também foi observada no controle. Não foi computada a durabilidade do estágio de pupa devido a ausência de indivíduos que completaram o estágio.

TABELA 4.4: Performance das lagartas de *A. gemmatalis* submetidas a concentrações de rutina e quercetina.

Tratamento	N	Sobrevivência (%)		Durabilidade (dias)		Amplitude	
		Lagarta	Pupa	Lagarta	Pupa	Lagarta	Pupa
Controle	14	50	7	15,14 ± 0,82	-	(11-28)	-
Quercetina 1 µmol/g	14	36	0	16,5 ± 1,62	-	(23-11)	-
Quercetina 3 µmol/g	14	43	0	16,63 ± 1,14	-	(11-23)	-
Quercetina 8 µmol/g	14	20	0	17,60 ± 0,31	-	(18-25)	-
Rutina 1 µmol/g	14	14	0	16,67 ± 0,31	-	(16-18)	-
Rutina 3 µmol/g	14	36	0	18,8 ± 1,15	-	(16-25)	-
Rutina 8 µmol/g	14	7	0	-	-	-	-

A análise dos valores de RGR (Figura 4.10) mostra de maneira geral uma toxicidade maior dos tratamentos de rutina em relação aos de quercetina.

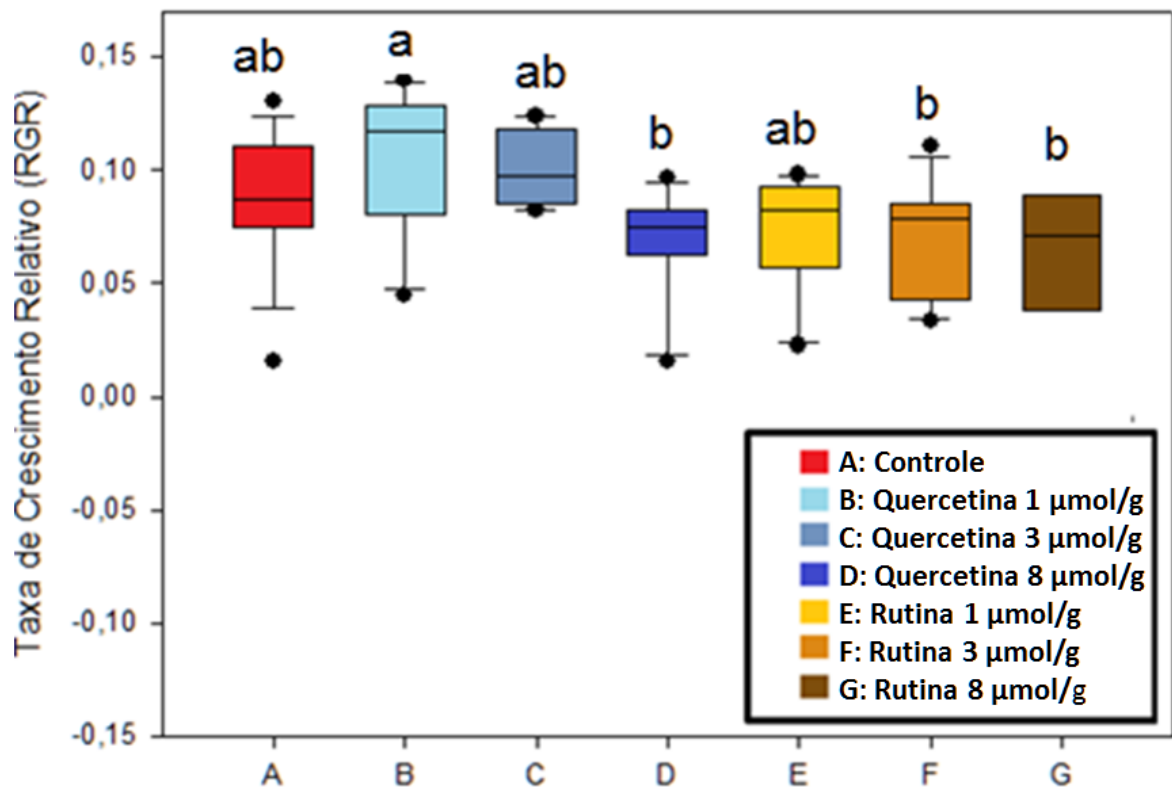


FIGURA 4.10: Taxa de crescimento relativo de *A. gemmatilis* se alimentando em dietas com concentrações diferentes de flavonoides(N=14). Blocos identificados com as mesmas letras não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tuckey (HSD) com 95% de confiabilidade.

Uma vez que foi utilizada uma dieta mínima, os efeitos tóxicos da rutina podem ser atribuídos ao baixo teor de proteínas na dieta. Dados da literatura (SALVADOR et al., 2010) mostram que dietas com caseína diminuem os efeitos tóxicos da rutina, quando comparado a dietas que não contém caseína. Outros trabalhos (HOFFMAN-CAMPO et al., 2006; PIUBELLI et al., 2005) mostram toxicidade dependente da concentração tanto para rutina quanto para quercetina. Porém, os trabalhos citados utilizam uma dieta proteica nos bioensaios, o que prejudica a comparação entre os experimentos. A não observação de outras diferenças entre os tratamentos é provavelmente devido à baixa sobrevivência dos insetos, diminuindo muito o número de indivíduos e consequentemente o poder dos testes estatísticos. (MAGALHÃES e LIMA, 2015).

4.3 - Toxicidade de flavonoides e preferências alimentares

Segundo reportado na literatura (SONG et al., 2014; GRAHAM, 1991) as concentrações de agliconas e glicosídeos de flavonoides variam de acordo com a idade e tecido da planta. Observa-se uma concentração maior de agliconas em tecidos mais próximos às raízes e em plântulas, enquanto a concentração de glicosídeos é maior em todo o período vegetativo.

De acordo com os hábitos alimentares de cada inseto, esperavam-se diferenças de toxicidade em relação à quercetina e rutina. Comparando os tratamentos com 8 $\mu\text{mol/g}$ de quercetina, *S. frugiperda* apresentou uma média de crescimento 15,3% maior que *A. gemmatalis*, tendo como base a diminuição do crescimento relativa ao controle de cada experimento. Essa observação pode ajudar a explicar por que *S. frugiperda* consegue se alimentar mais facilmente de plântulas, enquanto *A. gemmatalis* prefere folhas mais velhas.

Os dados são inconclusivos para se afirmar que os hábitos alimentares de cada espécie são influenciados pelo perfil químico da planta. Outros fatores, como a preferência pela oviposição em determinados lugares da planta e a morfologia de cada inseto e de cada tecido da planta devem ser levados em conta para esse tipo de análise (BERNAYS e CHAPMAN, 1994).

Não se pode deixar de considerar o fato de que flavonoides como rutina e quercetina deixaram de ser encontrados em alguns cultivares de soja comerciais (HOFFMAN-CAMPO et al., 2006). Dessa maneira, a falta de experiência do inseto com esses compostos pode contribuir para os efeitos tóxicos observados.

4.4 – Identificação dos metabólitos presentes nas fezes

Nessa sessão serão apresentados os resultados referentes a identificação dos metabólitos dos flavonoides quercetina, rutina e naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, coletadas no decorrer dos bioensaios. De acordo com as limitações das técnicas utilizadas, serão discutidos os aspectos estruturais de cada metabólito, no que diz respeito ao tipo e possível localização de determinada funcionalização nos diferentes esqueletos dos flavonoides utilizados.

Todas as estruturas de metabólitos apresentadas nesse capítulo são apenas **ilustrativas**, de modo que não refletem a real posição das substituições realizadas

pelos insetos. Os dados obtidos até o momento são insuficientes para concluir com exatidão sobre a posição dessas substituições.

4.4.1 – Metabólitos encontrados nas fezes dos insetos alimentados com quercetina.

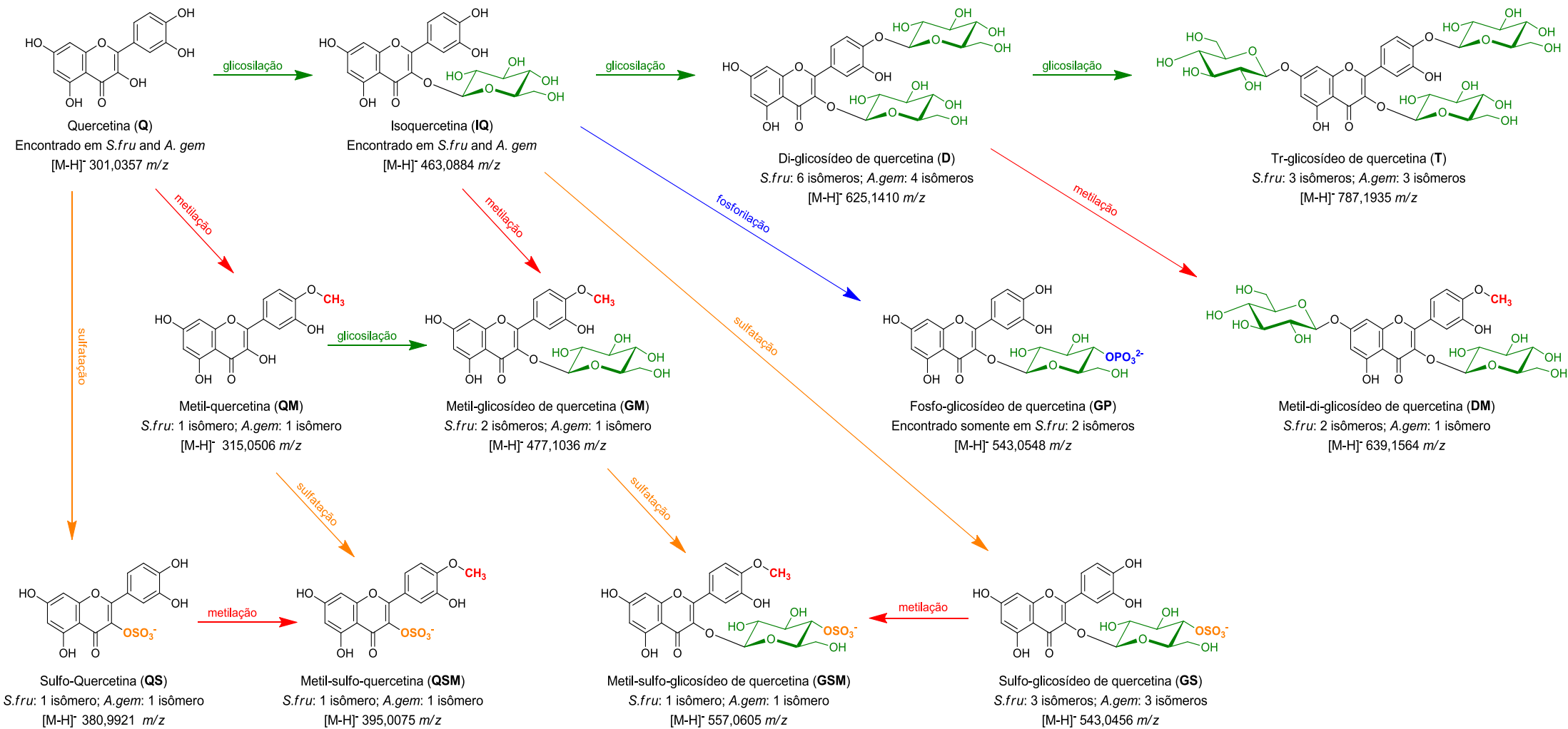
Foram encontrados tri-, di- e mono-glicosídeos de quercetina nas fezes dos dois insetos, assim como derivados sulfatados e metilados. Observou-se também uma mistura entre essas funcionalizações, como metabólitos metilados e glicosilados. *S. frugiperda* foi capaz de produzir ainda metabólitos glicosilados e fosforilados, além de produzir, em geral, uma quantidade maior de metabólitos que *A. gemmatalis*. O Esquema 4.2 sumariza os tipos e quantidade de metabólitos encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* enquanto as massas exatas e os tempos de retenção estão apresentados na Tabela 4.5 (*S. frugiperda*) e Tabela 4.6 (*A. gemmatalis*). Estão ordenados por classe de substância, seguindo do mais polar para o menos polar. As massas exatas apresentadas na tabela foram obtidas a partir do modo *scan* utilizando o modo negativo e positivo de ionização. Os cromatogramas de íons extraídos (EIC) para cada classe de compostos apresentados a seguir foram obtidos a partir dessas massas exatas. As massas utilizadas para o cálculo do erro de massa (Δ , em ppm) foram obtidas no software de tratamento de dados do equipamento, Mass Hunter® (Agilent).

TABELA 4.5: Metabólitos encontrados nas fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo 8 μmol de quercetina.

Metabólitos encontrados	Tempo de retenção	$[\text{M-H}]^-$ (m/z)	$\Delta m/z$ (ppm)
Tri-glicosídeos	3,65-4,15		
T1	3,65	787,1934	0,508
T2	3,74	787,1935	0,381
T3	4,15	787,1936	0,254
Di-glicosídeos	4,13-5,35		
D1	4,13	625,1410	0,000
D2	4,48	625,1411	-0,160
D3	4,60	625,1411	-0,160
D4	5,18	625,1410	0,000
D5	5,18	625,1411	-0,160
D6	5,35	625,1409	0,160
Metil-di-glicosídeos	4,96-5,47		
DM1	4,97	639,1565	0,313
DM2	5,47	639,1569	-0,313
Fosfo-glicosídeos	4.48-4.87		
GP1	4,50	543,0548	-0,552
GP2	4,88	543,0543	0,368
Sulfo-glicosídeos	5,04-5,49		
GS1	5,04	543,0456	-1,105
GS2	5,30	543,0456	-1,105
GS3	5,49	543,0451	-0,184
Metil-sulfo-glicosídeo			
GSM1	5,69	557,0605	0,359
Isoquercetina			
G1	5,91	463,0883	-0,216
Metil-mono-glicosídeos	6,53-6,87		
GM1	6,53	477,1036	0,420
GM2	6,87	477,1039	-0,210
Sulfatado			
QS1	7,23	380,9921	0,262
Sulfo-metilado			
QSM1	7,47	395,0075	0,759
Quercetina			
Q1	7,78	301,0353	0,332
Metilado			
QM1	8,62	315,0506	1,270

TABELA 4.6: Metabólitos de quercetina encontrados nas fezes de *A. gemmatali* alimentada com 8 μmol de quercetina.

Metabólitos encontrados	Tempo de retenção	[M-H] ⁻ , [M+H] ⁺ ou [M+Na] ⁺ (m/z)	Δ m/z (ppm)
Tri-glicosídeos	3,70-4,28		
T4	3,70	787,1942	-0,508
T5	4,12	787,1941	-0,381
T6	4,28	787,1940	-0,254
Di-glicosídeos	4,63-5,51		
D7	4,63	625,1412	-0,320
D8	5,00	625,1412	-0,320
D9	5,21	625,1413	-0,480
D10	5,51	625,1411	-0,160
Metil-di-glicosídeo			
DM3	4,78	639,1564	0,469
Sulfo-glicosídeos	5,09-5,55		
GS4	5,09	543,0455	16,573
GS5	5,35	543,0472	13,442
GS6	5,55	543,0496	9,023
Metil-sulfo-glicosídeo			
GSM2	5,69	557,0604	0,539
Isoquercetina			
G2	5,92	463,0884	-0,432
Metil-glicosídeo			
GM3	6,60	501,1003	0
Sulfatado:			
QS2	7,48	380,9925	-0,787
Sulfo-metilado			
QSM2	7,52	395,0081	-0,759
Quercetina			
Q	8,01	301,0357	-0,997
Metilado			
QM2	8,62	317,0657	-0,315



ESQUEMA 4.2: Estruturas representativas dos metabólitos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.1 – Tri-glicosídeos de quercetina

Os picos mostrados na Figura 4.11 foram atribuídos a tri-glicosídeos devido à presença do íon de m/z 787,1918 no espectro de HRMS de cada um, como também das fragmentações 625,1410 e 463,0882, correspondentes a quercetina di- e mono-glicosilada, no espectro de MS^2 do íon 787,1918 (Figura A.4). Essa massa é correspondente ao $[M-H]^-$ de uma quercetina tri-glicosilada. Esses fatos, juntamente o tempo de retenção baixo, sugerem a presença de tri-glicosídeos na amostra. Essas moléculas foram encontradas nas frações 70:30 $H_2O/MeOH$ das extrações em fase sólida tanto para *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

Os perfis apresentados pelos tri-glicosídeos (**T1-T6**) sugerem a presença de dois pares de isômeros muito parecidos. Provavelmente os compostos **T1** e **T2** podem ser isômeros das posições 3' e 4' ou 5 e 7, devido ao fato de serem bastante equivalentes e alterarem de maneira semelhante a polaridade da molécula (HIRAYAMA et al., 2008). O mesmo pode ser observado para os compostos **T5** e **T6**. Os tri-glicosídeos **T3** e **T4** parecem ter um padrão de substituição diferente do comentado para os pares **T1-T2** e **T5-T6**, de modo que o padrão apresentado por **T3** deixa a molécula mais apolar, enquanto que **T4** tem um padrão mais polar do que o par de isômeros presentes nas fezes de *A. gemmatalis*.

O fato de não serem observadas quebras parciais dos açúcares ajuda a reforçar a ideia de que estão presentes apenas O-glicosídeos, possibilitados pela estrutura da quercetina, que possui cinco sítios possíveis para a glicosilação (COLOMBO et al., 2006). Essa observação pode ser estendida para o restante dos glicosídeos apresentados nesse trabalho, incluindo os glicosídeos que sofreram outras funcionalizações, como metilação e sulfonação.

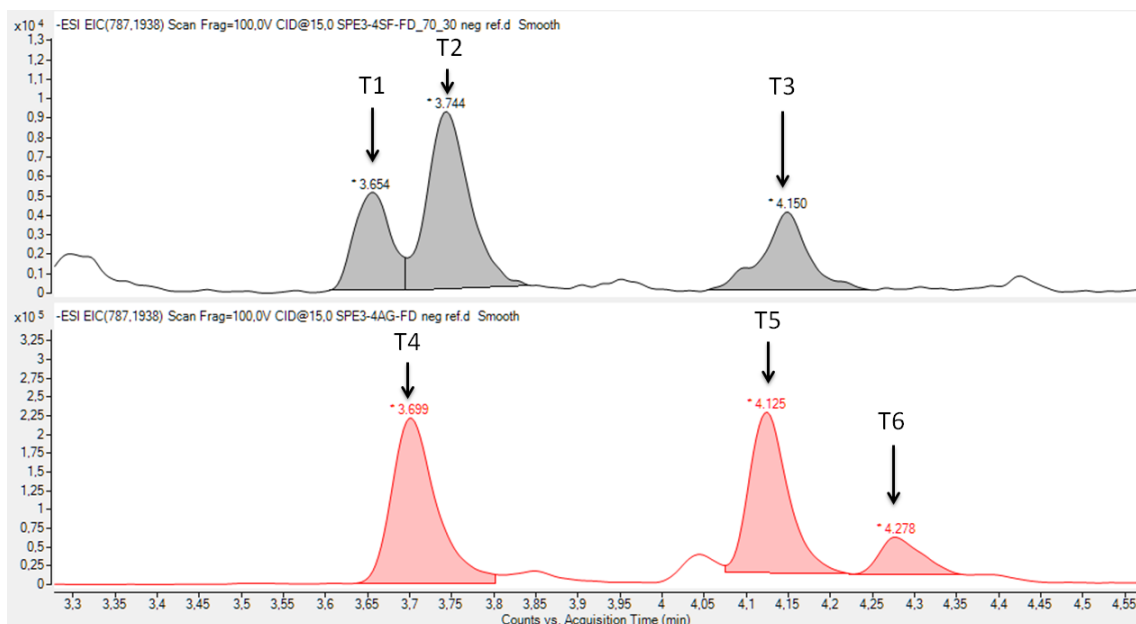


FIGURA 4.11: Cromatogramas de EIC para os tri-glicosídeos de quercetina encontrados nos extratos de fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.2 – Di-glicosídeos de quercetina

Estão apresentados na Figura 4.12 os resultados referentes aos metabólitos de quercetina di-glicosilados (**D1-D10**) encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. Os cromatogramas foram obtidos das frações 70:30, para ambos os insetos. Para ser considerado um di-glicosídeo, o metabólito deveria ter um tempo de retenção adequado (menor do que a quercetina e maior do que os tri-glicosídeos) e apresentar transições específicas no seu espectro de MS², apresentado na Figura A.5. As transições esperadas deveriam ser resultantes das fragmentações do íon de m/z 625,1410. Deveriam ser observadas as perdas de glicose (m/z 162), resultando em m/z 463,0882 e 301,0354, referentes ao mono-glicosídeo e à aglicona, respectivamente.

O perfil observado sugere novamente a presença de isômeros em posições bem próximas nas fezes de *S. frugiperda*, representados agora pelo par **D2 – D3**. O desvio de uma unidade de m/z em algumas fragmentações pode ser devido à formação de um composto quinônico, resultando na perda de um próton (SPENCER et al., 2003). Para os compostos observados nas fezes *A. gemmatalis* não foi observada tal relação.

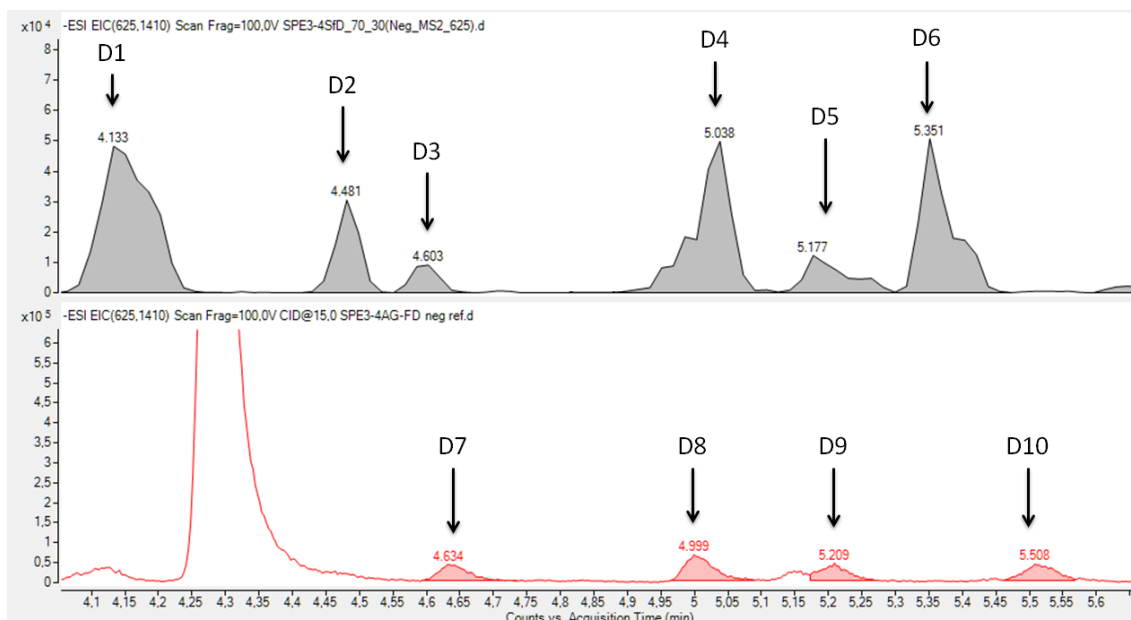


FIGURA 4.12: Cromatograma EIC para os di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.3 – Metil-di-glicosídeos de quercetina.

Foram observados também metabólitos di-glicosilados e metilados (**DM1-DM3**, Figura 4.13) na fração 70:30 dos extratos de fezes de ambos os insetos. Sua identificação foi realizada através do íon de m/z 639,1567 e de seu espectro de MS/MS (Figura A.6). Foram observadas fragmentações referentes ao monoglicosídeo e aglicona metilados (477,1038 e 315,0510 m/z respectivamente) para **DM1** e **DM3**. Para **DM2** observa-se apenas a fragmentação referente à aglicona metilada (LEE, 2012). O fato de o tempo de retenção ser menor do que outros di-glicosídeos não segue a ordem de polaridade esperada para esse tipo de substituição. Porém, já foi observado que a presença de uma metila pode diminuir o tempo de retenção de salicínoides glicosilados em colunas C_{18} (BOECKLER et al., 2016). No caso de di-glicosídeos, o padrão de substituição é o que mais afeta o tempo de retenção, ao passo que diferentes posições alteram mais ou menos a polaridade da molécula (HIRAYAMA et al., 2008). A presença de uma metila pode favorecer determinada conformação, podendo resultar em um momento dipolar maior e diminuir o tempo de retenção de um composto após a metilação.

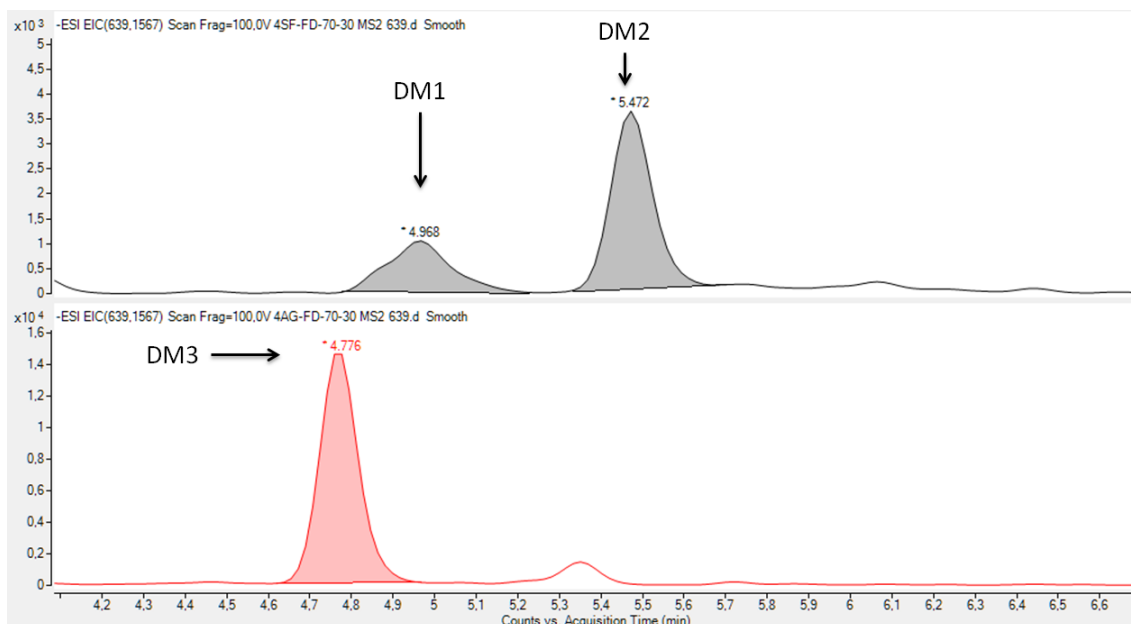


FIGURA 4.13: Cromatograma EIC para os metil-di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.4 – Derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de quercetina

Os metabólitos glicosilados e sulfatados (**GS1-GS6**) ou glicosilados e fosforilados (**GP1-GP2**) foram identificados nos cromatogramas das frações 70:30, apresentados na Figura 4.14. O tempo de retenção condiz com as relações já observadas para flavonoides fosforilados e sulfatados frente suas respectivas agliconas, sendo os fosforilados mais polares que os sulfatados e ambos menos polares que os di-glicosídeos (BRAND et al., 2008, ZHOU et al., 2011). A diferenciação entre derivados sulfatados e fosforilados só foi possível por se tratar de um equipamento de alta resolução, uma vez que a diferença de m/z entre suas moléculas protonadas é de menos de 0,0100.

Na Figura A.7 estão apresentados os espectros de MS/MS dos metabólitos em questão. Partindo do íon de m/z 543,0545, obtêm-se as fragmentações m/z 381,0017 e 301,0354, referentes à perda neutra de uma glicose e do grupo fosfato, restando somente a aglicona nos espectros de MS/MS de **GP1** e **GP2**. Para o glicosídeo sulfatado **GS3**, a relação é a mesma, porém agora as massas envolvidas são de m/z 543,0450, 380,9922, 301,0354. Isso indica que a sulfatação e fosforilação desses compostos ocorre na aglicona, e não no açúcar, como ocorre em salicinoides metabolizados por *Lymantria dispar* (BOECKLER et al., 2016). Os

compostos **GS1**, **GS2**, **GS4-GS6** não apresentam a fragmentação referente à aglicona sulfatada indicando que possivelmente esses compostos são sulfatados na glicose e não na aglicona. Esses dados sugerem então que apenas *S. frugiperda* é capaz de sulfatar e fosforilar a quercetina em sua forma aglicona, enquanto *A. gemmatalis* sulfata a quercetina apenas em sua forma glicosilada. É possível também que as energias de fragmentação utilizadas não sejam adequadas para que o fragmento em questão fosse observado nos compostos que supostamente foram sulfatados na glicose. A diferença no perfil cromatográfico observado para **GS1-GS2** e para **GS4-GS5** poder ser um indicativo das diferentes posições preferidas para a funcionalização dos insetos estudados, como também apenas devido a um efeito matriz, gerado pelas especificidades das fezes de cada inseto.

Deve-se ressaltar que ocorre, de fato, uma co-eluição dos compostos **D2** e **GP1**, nos tempos de retenção de 4,48 e 4,50 min. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que não foi observada a fragmentação m/z 543 no espectro de MS^2 referente ao íon de m/z 625,1410, descartando a possibilidade do pico de m/z 543,0538 ser uma fragmentação de 625,1410. Além disso, ambos os íons (m/z 625,1410 e 543,0538) forneceram as fragmentações esperadas para justificar a classe de compostos atribuídas. Mesmo assim, o pico poderia ser então um metabólito diglicosilado e sulfatado. Ao se procurar pela massa correspondente, não se encontra nenhum resultado, ajudando a suportar a hipótese da co-eluição.

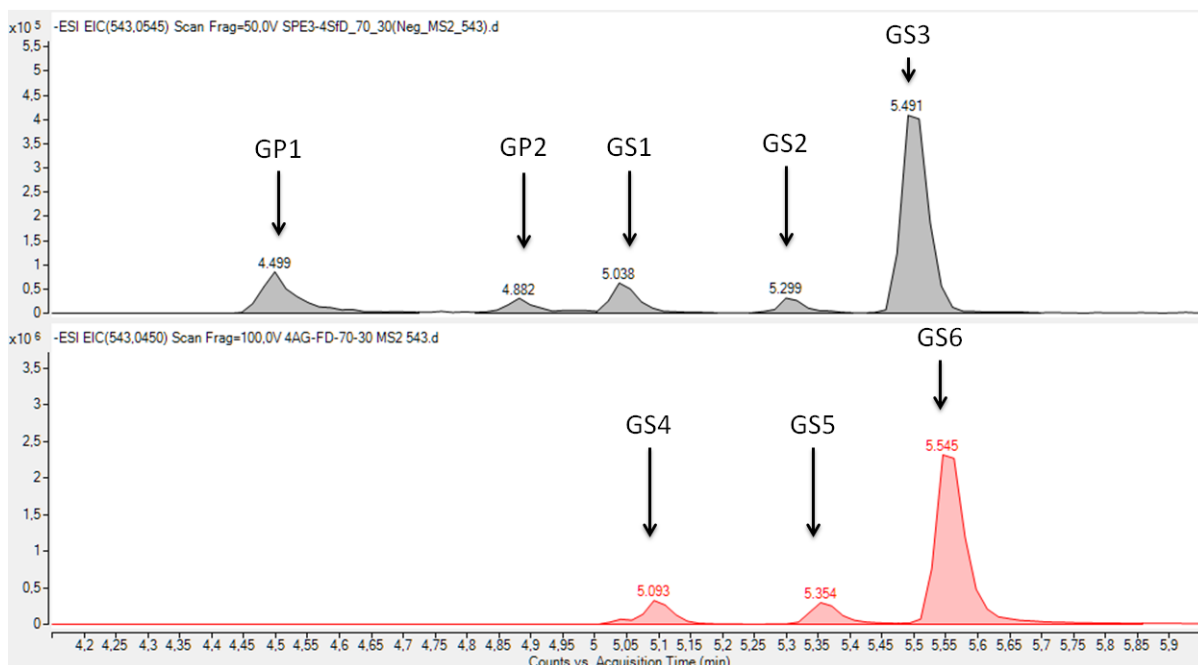


FIGURA 4.14: Cromatograma EIC para os derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de quercetina encontradas nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.5 – Derivado metil-sulfo-glicosilado de quercetina

Ainda na série dos glicosídeos, observou-se um metabólito glicosilado, sulfatado e metilado para cada inseto, sendo **GSM1** metabolizado por *S. frugiperda* e **GSM2** por *A. gemmatalis*. Ambos os compostos estavam presentes nas frações 70:30 dos extratos de fezes dos dois insetos (Figura 4.15). Esses derivados foram identificados através da massa exata correspondente ao íon $[M-H]^-$, m/z 557,0607 e seus tempos de retenção, os maiores da série de glicosídeos sulfatados e fosforilados. Os espectros de HRMS (Figura A.8) têm íons que ajudam na atribuição de **GSM1** e **GSM2** como glicosídeos sulfatados e metilados. São eles: m/z 557,0607 ($[M-H]^-$), 477,1038 (perda de sulfato), 463,0882 (aglicona glicosilada) e 301,0356 (aglicona).

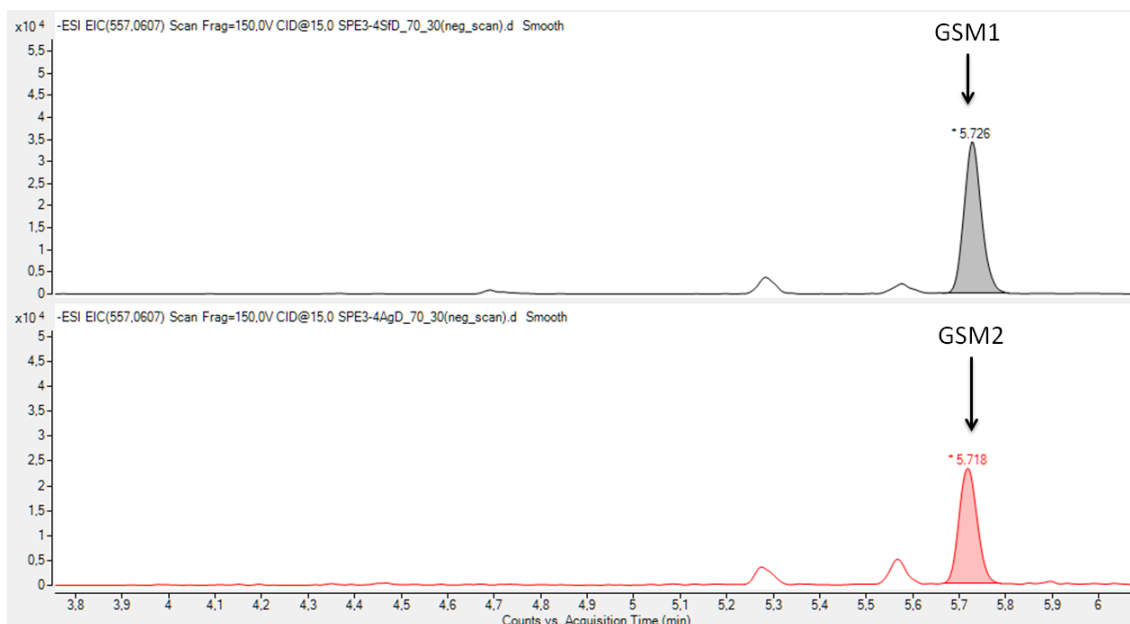


FIGURA 4.15: Cromatograma EIC para os derivados metil-sulfo-glicosilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.6 – Isoquercetina

A Figura 4.16 apresenta o único metabólito mono-glicosilado detectado nessas análises, sendo **G1** o metabólito encontrado nas frações 70:30 das fezes de *S. frugiperda* e **G2** nas fezes de *A. gemmatalis*. O tempo de retenção desses compostos está dentro do esperado, sendo menor que o da quercetina e maior que os glicosídeos que sofreram outras funcionalizações com grupos mais polares.

Os espectros de MS², apresentados na Figura A.9, revelam fragmentos característicos da sua classe. O íon precursor de m/z 463,0883 resulta no fragmento correspondente à aglicona sem um próton, m/z de 300,0296. Porém, nenhum dos fragmentos que possivelmente dariam informações sobre a posição do açúcar pôde ser observado. Em busca da posição da glicose na molécula, realizou-se a co-injeção com uma solução padrão de isoquercetina (quercetina 3-O-glicosídeo) juntamente com a amostra de extrato de fezes de *S. frugiperda*. O resultado mostrou que **G1** e **G2** são, na realidade, isoquercetina, uma vez que demonstraram exatamente o mesmo tempo de retenção e padrões de fragmentação do que o padrão de isoquercetina. Foi realizado também um experimento de *spike* com isoquercetina. Uma solução padrão de isoquercetina foi adicionada na amostra de extrato de fezes (fração 70:30) de *S. frugiperda*. Observou-se o aumento do pico em

5,91 minutos na amostra de fezes à medida que se adiciona isoquercetina, confirmando que o composto **G1** é isoquercetina.

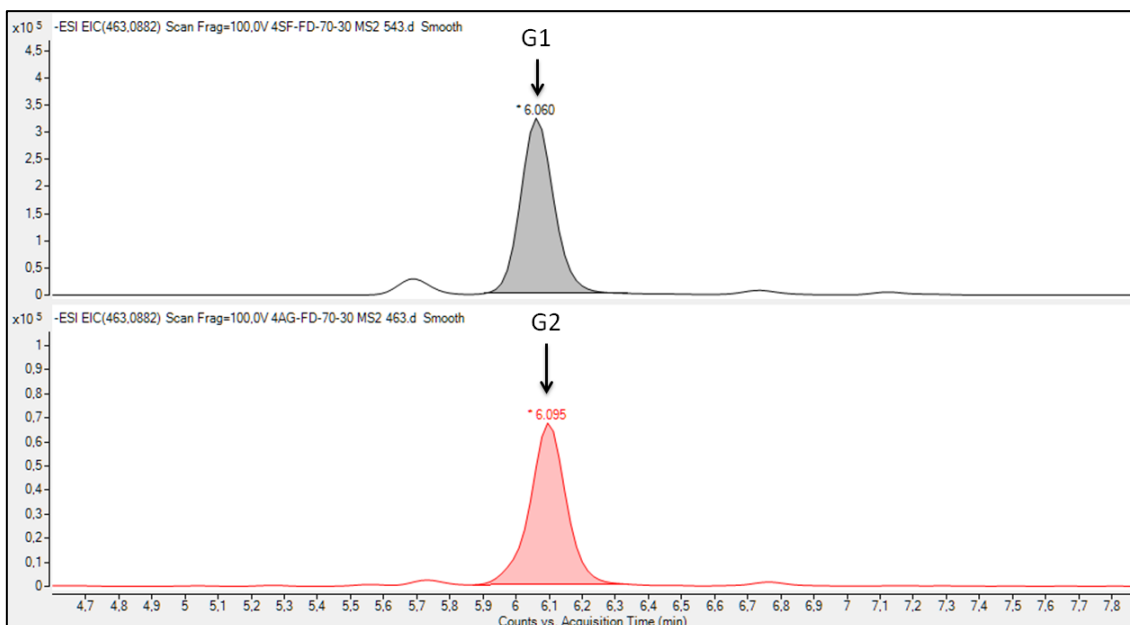


Figura 4.16: Cromatograma EIC para a isoquercetina encontrada nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina

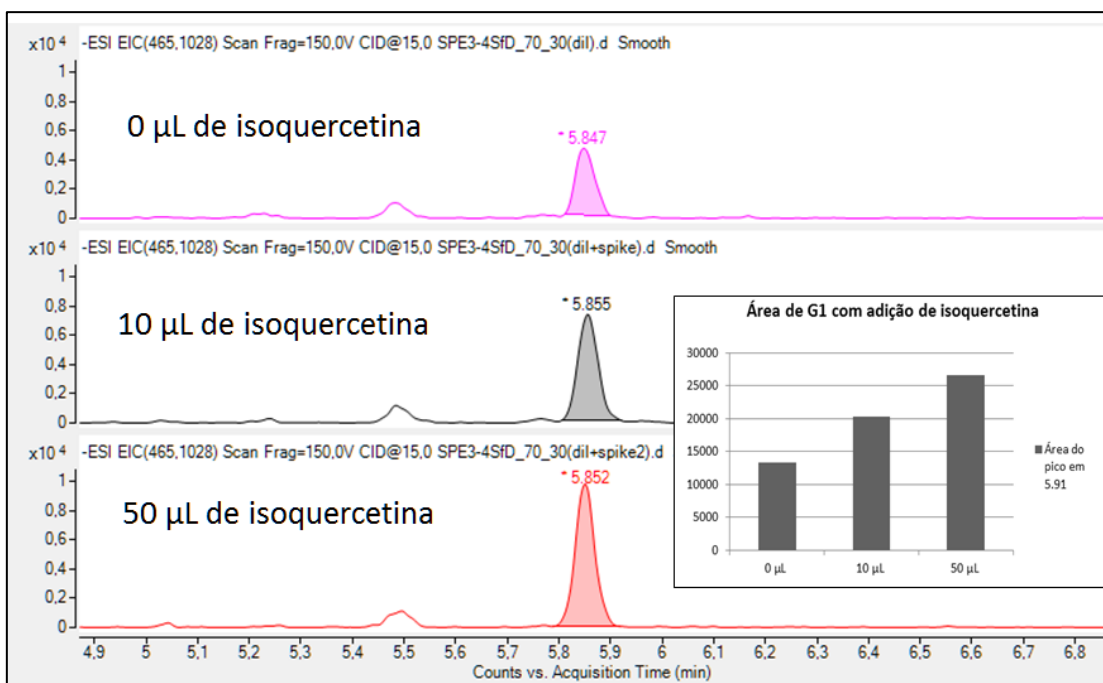


FIGURA 4.17: Experimento de *spike* com isoquercetina nos extratos de fezes de *S. frugiperda*.

4.4.1.7 – Metil-mono-glicosídeos de quercetina

Como últimos glicosídeos da série, os dois metabólitos glicosilados e metilados (**GM1-GM3**) estão representados pelos dados da Figura 4.18. Com o

tempo de retenção coerente, os mono-glicosídeos metilados aparecem na região de 6,50 min, nos extratos das frações de 70:30 de *S. frugiperda* e nas frações 10:90 de *A. gemmatalis*.

Os espectros de MS² de **GM1**, **GM2** e **GM3** (Figura A.10) mostram o precursor com m/z 477,1035, gerando um fragmento de m/z 314,0455, provavelmente correspondente à aglicona metilada. O tempo de retenção é condizendo com as substituições propostas, uma vez que seria o mais apolar da série de mono-glicosilados dos extratos de *A. gemmatalis*.

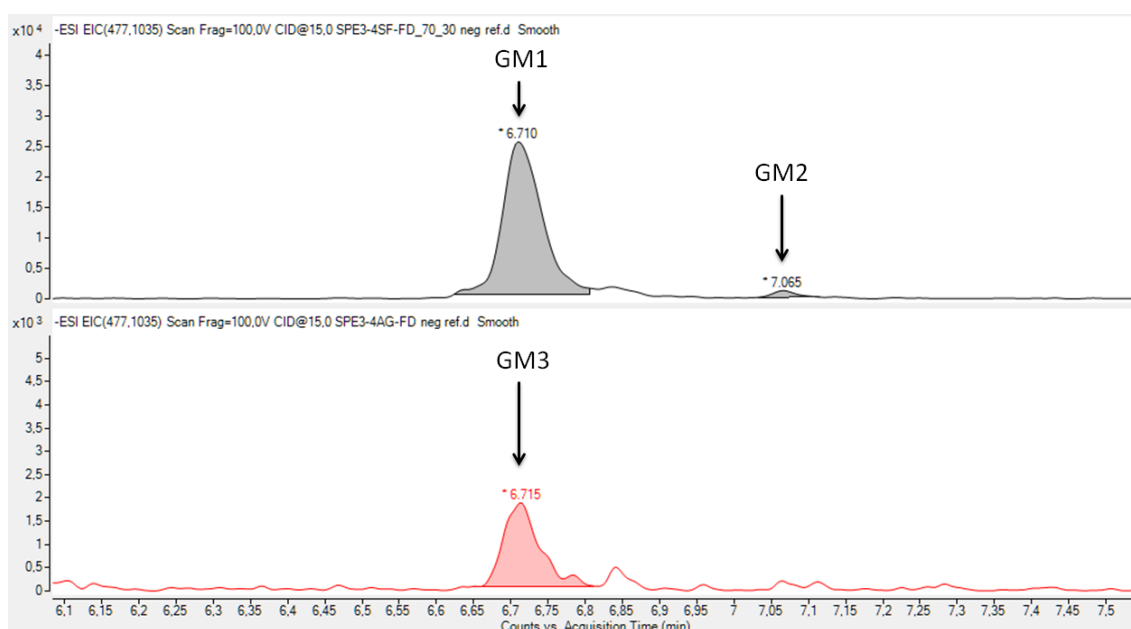


FIGURA 4.18: Cromatograma de EIC e espectros de MS/MS para os metil-mono-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.8 – Derivados sulfatados de quercetina

Em 7,23 minutos, observa-se um pico referente a quercetina sulfatada (**QS1** e **QS2**, Figura 4.19). O tempo de retenção é coerente com o esperado, eluindo antes da quercetina e depois dos glicosídeos (ZHOU et al., 2011). O espectro de MS², apresentado na (Figura A.11) não revela muitas informações estruturais, apenas mostra a fragmentação relativa à perda do sulfato (m/z 301,0354) e outras referentes a reações de reto-Diels-Alder (RDA) sofridas pelo esqueleto da aglicona, como m/z 151,0050 (FABRE et al., 2001). Ambos compostos foram identificados nas frações de 70:30.

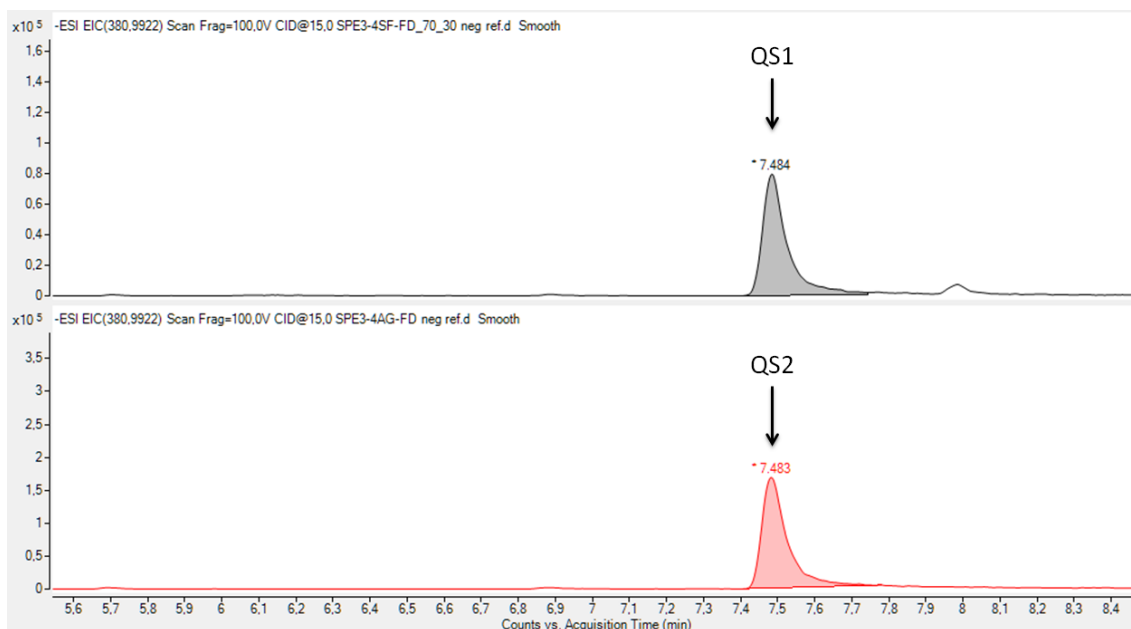


FIGURA 4.19: Cromatograma EIC para os derivados sulfatados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatilis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.1.9 – Derivados sulfo-metilados de quercetina

Em 7,66 min dos cromatogramas dos extratos de fezes das frações 70:30, observa-se um pico provavelmente relacionado a quercetina sulfatada e metilada (**QSM1** e **QSM2**, Figura 4.20). Aparecendo antes da aglicona e depois do derivado sulfatado, **QSM1** e **QSM2** tem um tempo de retenção dentro do esperado para sua classe. O espectro de MS² de **QSM1** revela apenas a fragmentação correspondente à aglicona sem os grupos sulfato e metila, como também fragmentos resultantes de quebras no esqueleto da aglicona (FABRE et al., 2001). **QSM2** tem um espectro de MS/MS que apresenta as fragmentações referentes à aglicona metilada, aglicona e ainda o fragmento 1,2-A⁻CO da quercetina. Ambos espectros de MS² são apresentados na Figura A.12.

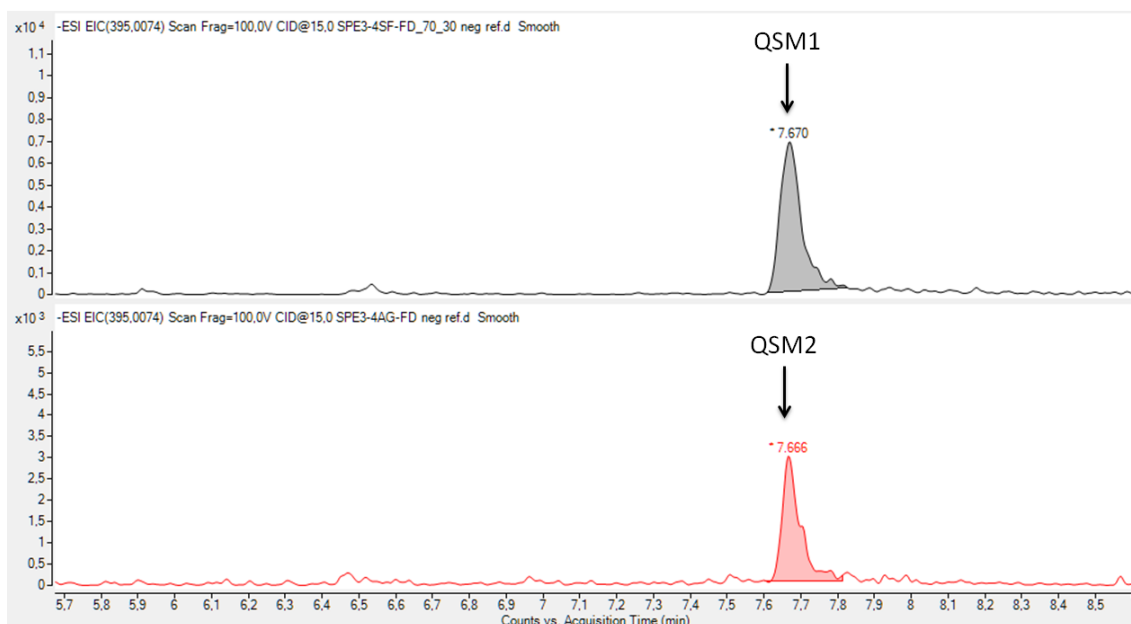


FIGURA 4.20: Cromatograma EIC para os derivados sulfo-metilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

A Figura A.13 mostra a quercetina que foi excretada sem modificações por *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* e seu espectro de MS/MS. Ambos os cromatogramas foram derivados das frações 70:30. Seu tempo de retenção, assim como o padrão de fragmentação, foi comparado com o de um padrão de quercetina, revelando que o composto encontrado em 7,78 min nas fezes é, na realidade, quercetina não modificada. Seu espectro de MS/MS tem como fragmentação bastante intensa o íon m/z 151,0040, referente a fragmentação 1,2-A⁻-CO, formada após uma RDA (quebrando as ligações 1 e 2 do anel C) e a perda de uma molécula de CO. Esse fragmento teria a carga concentrada no anel A (FABRE et al., 2001). Outros fragmentos já descritos na literatura como comuns da quercetina também foram observados: [M-H]⁻-anel B (193,0135 m/z), 1,2-B⁻ (121,0288 m/z), 1,2-A⁻ (178,9979 m/z) e 1,2-A⁻-CO-CO₂ (107,0132 m/z). (FABRE et al., 2001, MCNAB et al., 2009).

4.4.1-10 – Derivados metilados de quercetina

Em 8,56 min da corrida cromatográfica (Figura 4.21), encontram-se os derivados metilados de quercetina (**QM1** e **QM2**). Os picos têm tempo de retenção maior que o da quercetina, o que seria esperado para esse tipo de funcionalização. O espectro de MS/MS de **QM1** revela o precursor de m/z 315,0510 gerando a aglicona e suas fragmentações usuais via RDA comentadas acima (FABRE et al., 2001). **QM2** se encontrava em maior concentração na fração 10:90 das fezes de *A.*

gemmatalis, ao contrário do composto gerado por *S. frugiperda*. O espectro de HRMS de **QM2** tem a presença de 317,0656 e 303,0499 *m/z*, sugerindo a contribuição de quercetina metilada e quercetina em sua forma de aglicona, respectivamente. Tanto o espectro de HRMS de **QM2** quando o MS/MS de **QM1** estão apresentados na Figura A.14. O seu tempo de retenção, maior da série dos metabólitos de quercetina nas fezes de *A. gemmatalis* ajuda a reforçar a classe proposta.

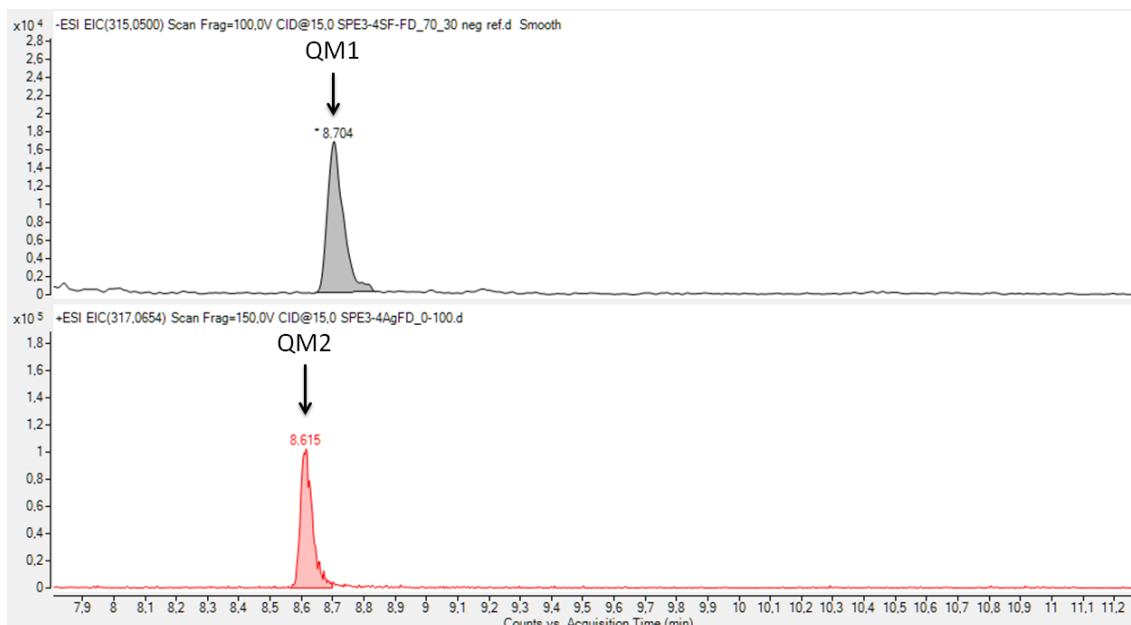
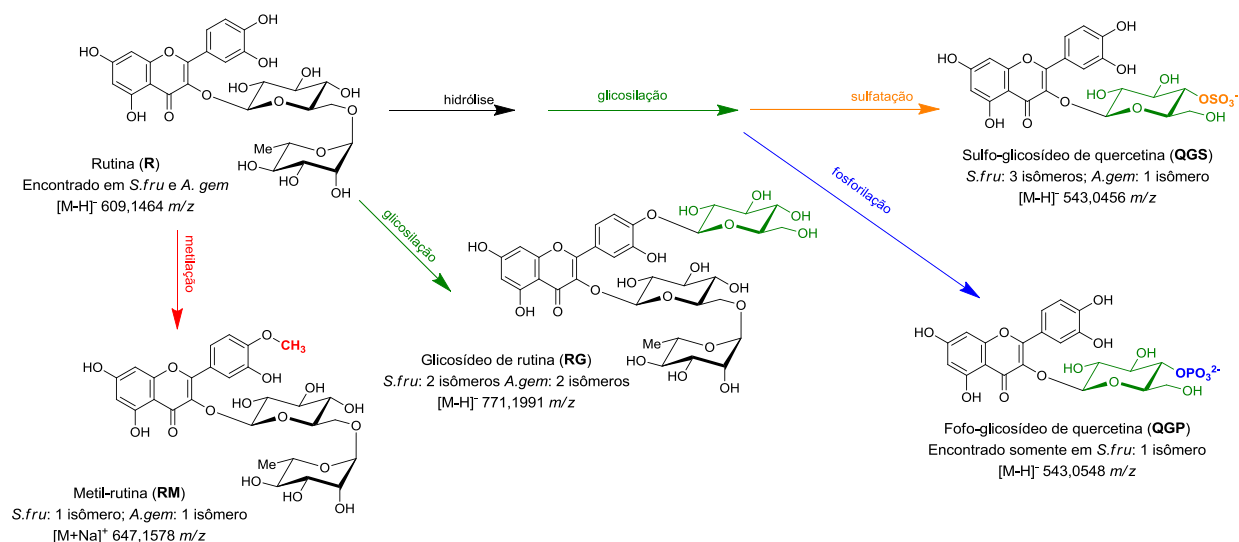


FIGURA 4.21: Cromatograma EIC para os metabólitos metilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo quercetina.

4.4.2 – Metabólitos encontrados nas fezes dos insetos alimentados com rutina.



ESQUEMA 4.3: Estruturas representativas dos metabólitos de rutina encontrados nas fezes *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo rutina.

O esquema 4.3 sumariza os tipos e quantidades de metabólitos encontrados nas fezes dos dois insetos estudados, enquanto as informações relativas ao tempo de retenção e às massas exatas das moléculas desprotonadas ou adutos de sódio estão contidas na Tabela 4.7, para *S. frugiperda* e na Tabela 4.8 para *A. gemmatalis*. Estão presentes derivados glicosilados e metilados nas fezes dos dois

insetos, produzindo menos glicosídeos do que quando são alimentados com quercetina. Observam-se também metabólitos de quercetina, sugerindo uma possível hidrólise da rutina e posterior funcionalização. Novamente, *S. frugiperda* produz um metabólito glicosilado e fosforilado, enquanto *A. gemmatalis* produz uma quantidade menor de metabólitos e nenhum fosforilado.

TABELA 4.7: Metabólitos de rutina encontrados nas fezes *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo 8 μmol de rutina.

Metabólitos encontrados	Tempo de retenção	[M-H] ⁻ ou [M+Na] ⁺ (m/z)	Δ m/z (ppm)
Glicosídeos	4,24-5,04		
RG1	4,34	771,1991	-0,259
RG2	5,19	771,1986	0,389
Derivados de quercetina	4,60-5,57		
QGP	4,56	543,0543	-17,126
QGS1	5,11	543,0457	-1,289
QGS2	5,39	543,0453	-0,552
QGS3	5,58	543,0450	0,000
Rutina			
R	5,87	609,1464	-0,492
Metilado			
RM1	6,42	647,1578	0,773

TABELA 4.8: Metabólitos de rutina encontrados nas fezes *A. gemmatalis* alimentada com dieta contendo 8 μmol de rutina.

Metabólitos sf. encontrados	Tempo de retenção	[M-H] ⁻ ou [M+Na] ⁺ (m/z)	Δ m/z (ppm)
Glicosídeos	4,24-5,04		
RG3	4,24	771,1991	-0,259
RG4	5,04	771,1986	0,389
Derivados de quercetina:			
QGS4	5,57	543,0478	-5,156
Rutina			
R	5,87	609,1464	-0,492
Metilado			
RM2	6,43	647,1578	0,773

4.4.2.1 – Glicosídeos de rutina

A Figura 4.22 mostra que a rutina também é glicosilada por *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. Os compostos mostrados foram identificados através da massa m/z 771,1989 e das fragmentações presentes no MS/MS. Foram observados 463,0882 (quercetina mono-glicosilada) e 609,1461 m/z (rutina) para **RG1**, **RG3** e **RG4**. **RG2** apresenta esses mesmos íons e também 301,0354 m/z , correspondente à aglicona (Figura A.15). Os tempos de retenção são condizentes com a classe de compostos proposta, sendo os mais polares da série de metabólitos de rutina nos extratos das frações 70:30 de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

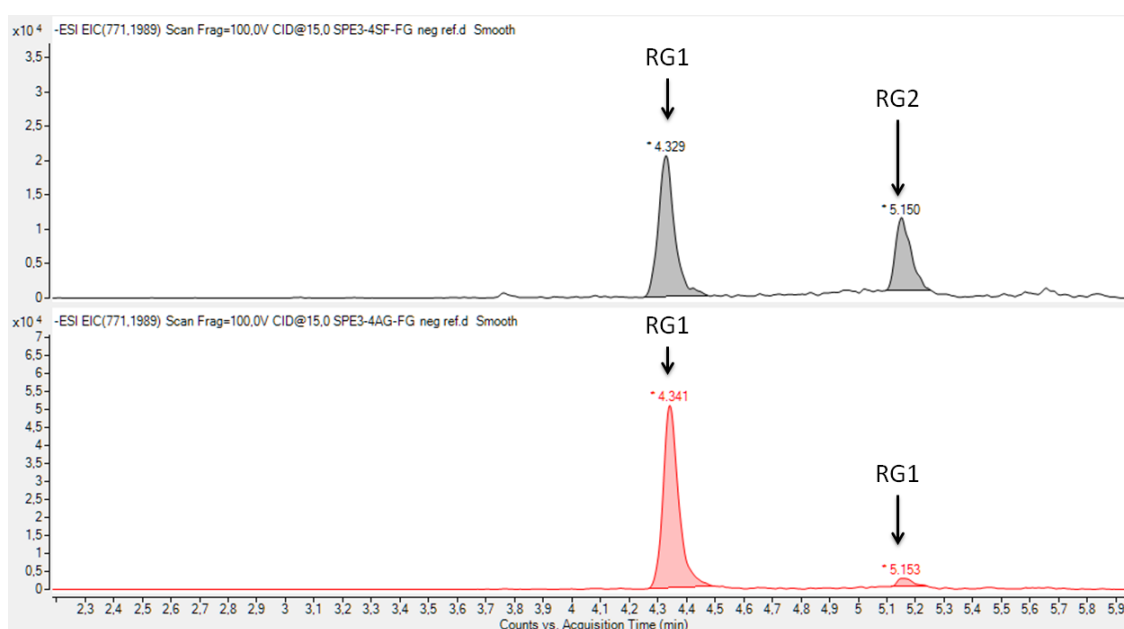


FIGURA 4.22: Cromatogramas EIC para a rutina glicosilada encontrada nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo rutina.

4.4.2.2 – Derivados de quercetina

Observa-se também a formação de derivados de quercetina nas frações 70:30 dos insetos alimentados com rutina. A Figura 4.23 mostra os metabólitos glicosilados e sulfatados de quercetina **QGS1-QGS4** e fosforilados **QGP**. **QGS1-QGS3** e **QGP** foram encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e **QGS4** nas fezes de *A. gemmatalis*. Os compostos produzidos por *S. frugiperda* foram identificados pela massa correspondente ao $[M-H]^-$ dessa classe de compostos (543,0450 e 543,0545 m/z) e pelo tempo de retenção característico, semelhante ao encontrado nos experimentos com quercetina. O íon 463,0882 m/z referente à quercetina mono-glicosilada também aparece nos espectros de **QGS1-QGS3**, sendo ausente em

QGP. Os espectros de HRMS desses compostos estão apresentados na Figura A.16.

O derivado **QGS4** foi identificado pelo tempo de retenção característico e por íons específicos presentes no seu espectro de HRMS. São encontrados os íons 543,0450 e 463,0882 m/z , referentes ao $[M-H]^-$ e a perda de glicose e sulfato. O fato de não ser observada a fragmentação referente à perda somente da glicose pode sugerir que a sulfatação acontece no açúcar.

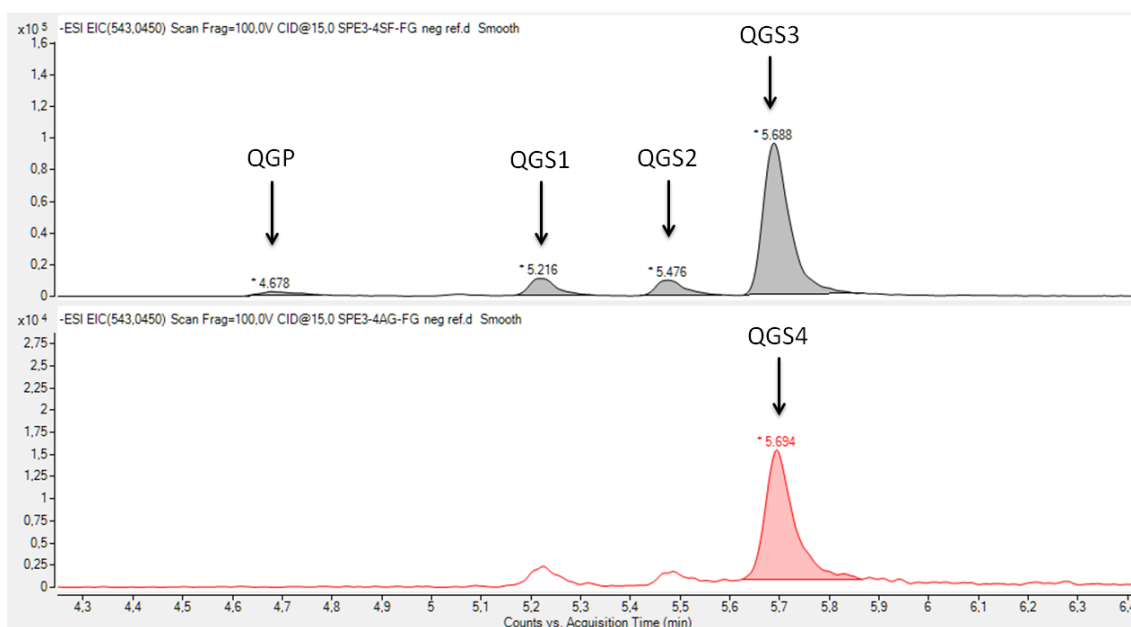


FIGURA 4.23: Cromatograma EIC para os metabólitos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo rutina.

A Figura A.18 apresenta a rutina encontrada nas frações 70:30 das fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. No espectro de MS/MS observa-se apenas o fragmento referente à aglicona, provavelmente devido ao fato de uma energia de colisão muito baixa para esse composto, uma vez que existe um pico intenso para $[M-H]^-$. O tempo de retenção também é condizendo com o observado em experimentos com padrão externo.

4.4.2.3 – Metilados de rutina

A Figura 4.24 mostra os metabólitos metilados de rutina **RM1** e **RM2** encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, nas frações 10:90. Esses derivados apresentam um tempo de retenção maior que o da rutina e m/z de 647,1583. O espectro de HRMS dos compostos (Figura A.17) também contém os

fragmentos m/z 317,0558 e 479,1184, ajudando a classificá-los como derivados metilados de rutina. Por ser observado a íon referente à quercetina metilada (317,0558 m/z), sugere-se que ambos os compostos foram metilados na quercetina e não nos açúcares. Porém, são necessários experimentos de MS/MS para que tais sugestões sejam confirmadas.

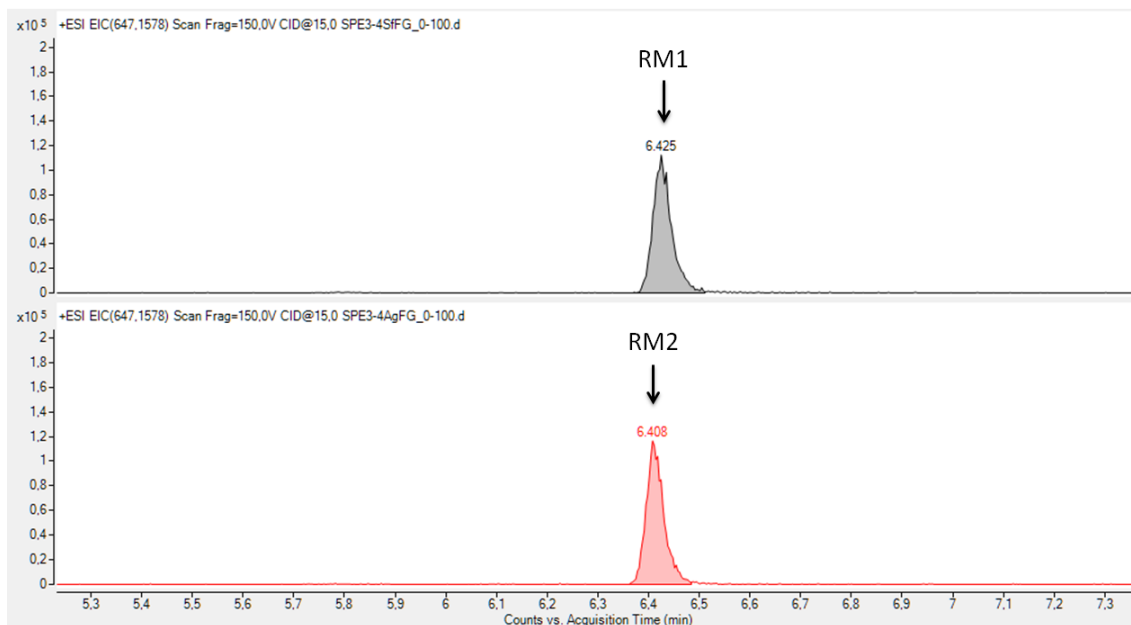
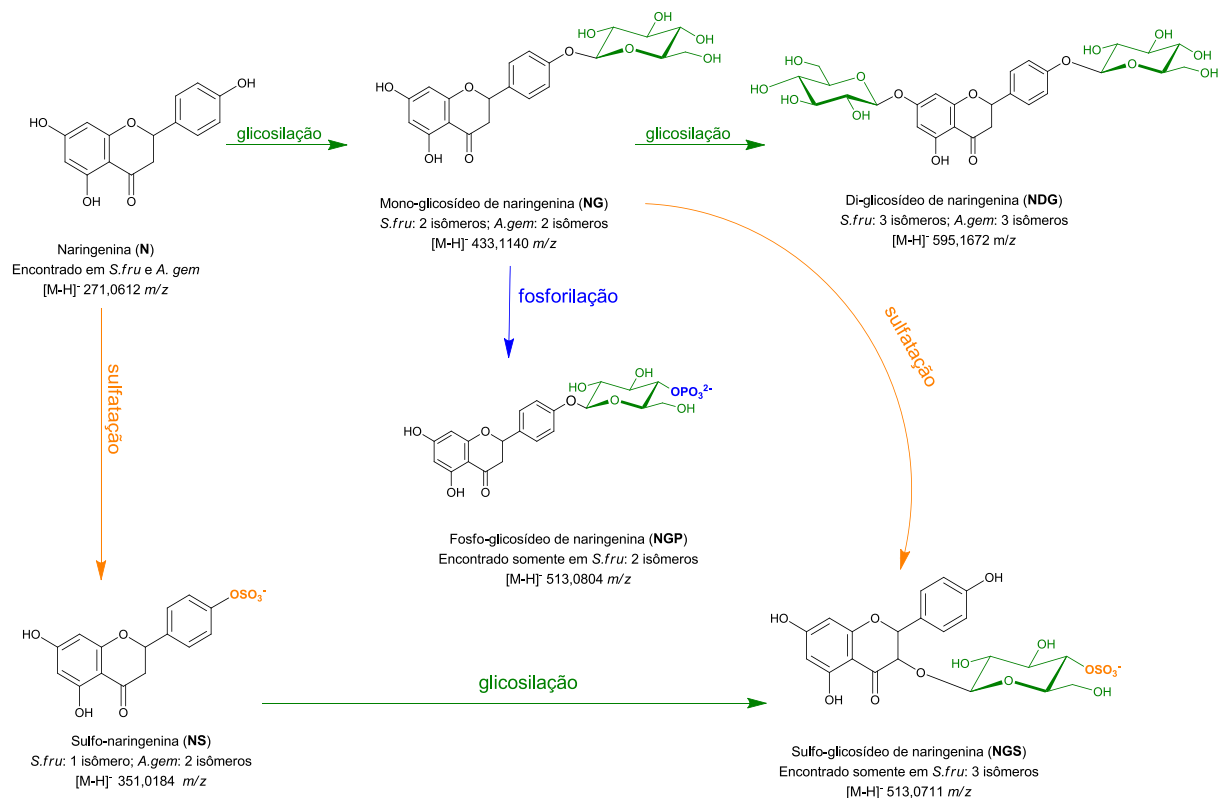


FIGURA 4.24: Cromatogramas EIC os metabólitos metilados de rutina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo rutina.

4.4.3 – Metabólitos encontrados nas fezes dos insetos alimentados com naringenina



ESQUEMA 4.4: Estruturas representativas dos metabólitos encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo naringenina.

Quando os insetos foram alimentados com dieta contendo naringenina, encontrou-se di e mono-glicosídeos para ambos os insetos, porém nenhum derivado metilado foi observado. Foi produzida uma quantidade menor de di-glicosídeos do que nos experimentos com quercetina, porém observaram-se mais mono-glicosídeos e derivados sulfatados não glicosilados. Novamente, apenas *S. frugiperda* produziu glicosídeos fosforilados.

Abaixo estão apresentados os tempos de retenção e as massas exatas das moléculas desprotonadas dos metabólitos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (Tabela 4.9) e *A. gemmatalis* (Tabela 4.10) alimentadas com dieta contendo naringenina, enquanto o Esquema 4.4 apresenta um resumo dos tipos e da quantidade de metabólitos.

TABELA 4.9: Metabólitos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta contendo naringenina.

Metabólitos encontrados	Tempo de retenção	[M-H] ⁻ (m/z)	Δ m/z (ppm)
Di-glicosídeos	4,18-6,03		
NDG1	4,18	595,1676	-1,344
NDG2	4,34	595,1675	-1,176
NDG3	6,03	595,1664	0,672
Sulfo-glicosídeos	4,62-5,54		
NGS1	4,62	513,0711	-0,585
NGS2	4,81	513,0716	-1,559
NGS3	5,54	513,0711	-0,585
Fosfo-glicosídeos	5,21-5,26		
NGP1	5,21	513,0804	-0,195
NGP2	5,26	513,0805	-0,3898
Mono-glicosídeos	6,02-6,64		
NG1	6,02	433,1140	0
NG2	6,64	433,1143	-0,693
Sulfatado:			
NS1	7,30	351,0184	-1,139
Aglicona			
N	8,32	271,0611	0,369

TABELA 4.10: Metabólitos de naringenina encontrados nas fezes de *A. gemmatilis* alimentada com dieta contendo naringenina.

Metabólitos encontrados	Tempo de retenção	[M-H] ⁻ (m/z)	Δ m/z (ppm)
Di-glicosídeos:	3,42-3,99		
NDG4	4,78	595,1672	-0588
NDG5	5,10	595,167	-0,336
NDG6	6,49	595,1671	-0,504
Mono-glicosídeo	5,46-5,81		
NG3	5,61	433,1145	-1,154
NG4	5,81	433,1141	-0,230
Sulfatado:	7,29-7,48		
NS2	7,29	351,0183	-0,855
NS3	7,48	351,0181	-0,285
Aglicona			
N	8,38	271,0612	-0,160

4.4.3.1 – Di-glicosídeos de naringenina

Na Figura 4.25 está presente o cromatograma dos di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes dos insetos alimentados com naringenina. Sugere-se essa classe de substância para os metabólitos **NDG1-NDG6**, devido ao menor tempo de retenção da série de metabólitos de naringenina e pelas

fragmentações obtidas no espectro de MS/MS, apresentado na Figura A.19. É possível observar o íon 595,1576 m/z , correspondente ao [M-H] da naringenina diglicosilada, gerando o fragmento correspondente à aglicona (271,0611 m/z). Para os metabólitos de *S. frugiperda* (**NDG1-NDG3**), é possível também observar a fragmentação referente a naringenina mono-glicosilada (433,1140 m/z). De acordo com esses fragmentos, pode-se sugerir que os glicosídeos de naringenina são todos O-glicosídeos, assim como os glicosídeos de rutina e quercetina.

Os extratos de fezes de ambos os insetos produzem perfis cromatográficos bem semelhantes. Aparentemente, cada inseto produz um par de isômeros de polaridade bem parecida, sugerindo que as funcionalizações ocorrem em posições bem equivalentes. Provavelmente essas posições são 5 e 7. Os pares de isômeros em questão seriam **NDG1-NDG2** para *S. frugiperda* e **NDG4-NDG5** para *A. gemmatalis*, sendo os dois pares encontrados na fração 70:30.

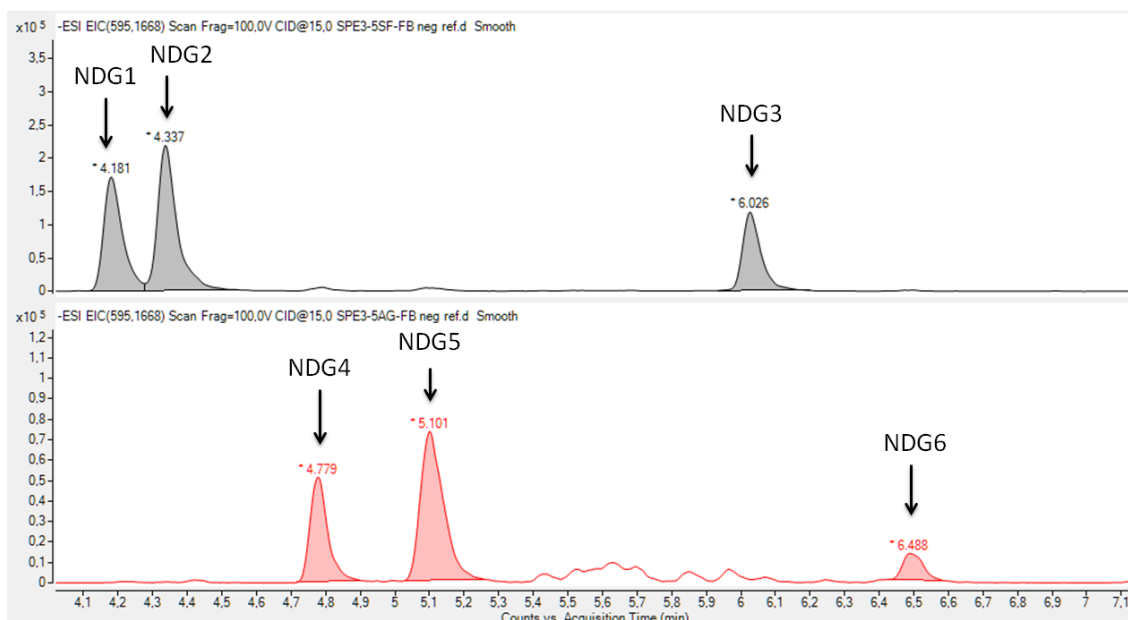


FIGURA 4.25: Cromatograma EIC para os di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.

4.4.3.2 – Derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de naringenina

Os metabólitos glicosilados, sulfatados ou fosforilados de naringenina se encontram na Figura 4.26. Esses metabólitos foram observados somente nos extratos de fezes *S. frugiperda*, na fração 70:30. Nos espectros de MS/MS (Figura A.20), observam-se fragmentações que sugerem fosforilação e sulfatação nos

glicosídeos de naringenina tanto na aglicona (somente sulfatação) como no açúcar (somente fosforilação), semelhante ao observado para essa classe de compostos nas fezes dos insetos alimentados com dieta contendo quercetina. Porém, para naringenina, observa-se que toda a sulfatação ocorre na aglicona, ao contrário de quercetina, onde é a fosforilação que é realizada somente na aglicona.

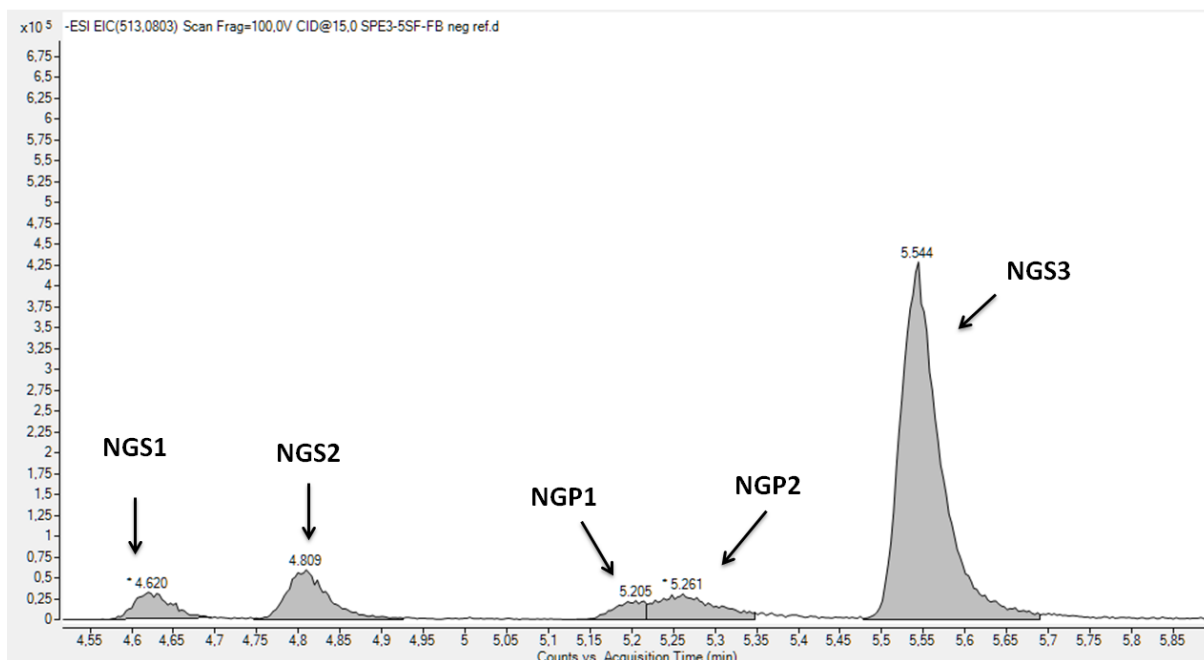


FIGURA 4.26: Cromatograma EIC para os di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.

4.4.3.3 – Mono-glicosídeos de naringenina

A Figura 4.27 apresenta os mono-glicosídeos de naringenina encontrados nos experimentos. Para os dois insetos, os cromatogramas são provenientes das frações 70:30. Para que fosse considerado um mono-glicosídeo, o tempo de retenção deveria ser menor do que a naringenina e maior do que os mono-glicosídeos, assim como apresentar as fragmentações características de mono-glicosídeos de naringenina. **NG1-NG4** apresentam o íon 271,0612 m/z no espectro de MS/MS do íon 433,1400 m/z , mostrados na Figura A.21.

O perfil cromatográfico sugere que *A. gemmatalis* produz dois mono-glicosídeos de tempo de retenção bastante parecido, sugerindo que são funcionalizados em posições equivalentes. As posições em questão poderiam ser a 5 e 7. *S. frugiperda* parece não se comportar da mesma maneira, produzindo mono-glicosídeos que tem maior diferença de polaridade entre si.

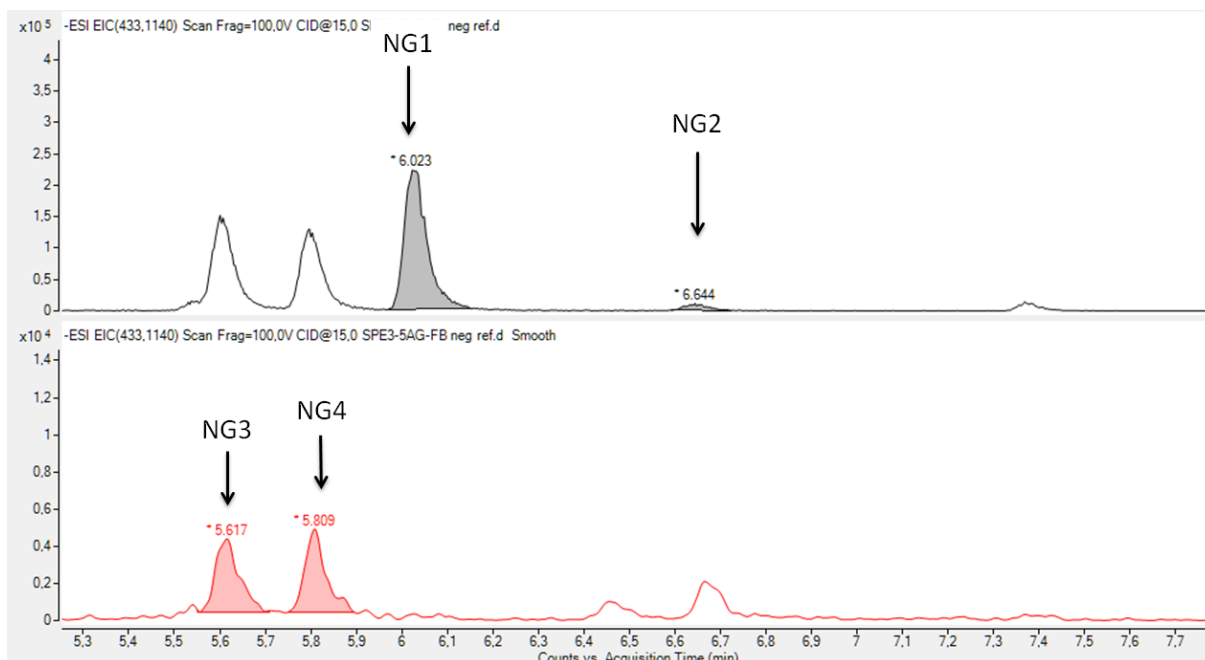


FIGURA 4.27: Mono-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.

4.4.3.4 – Derivados sulfatados de naringenina

Os cromatogramas referentes aos derivados sulfatados de naringenina estão apresentados na Figura 4.28, enquanto os espectros de MS/MS estão na Figura A.22. Esses metabólitos foram encontrados nas frações 70:30 dos extratos de fezes dos dois insetos. *S. frugiperda* produz um derivado sulfatado de naringenina (**NS1**), enquanto *A. gemmatalis* produz dois, **NS2** e **NS3**. Os dois derivados produzidos por *A. gemmatalis* tem tempos de retenção muito próximos, sugerindo novamente um padrão de substituição em posições equivalentes, como visto para alguns di-glicosídeos de naringenina e quercetina. Os espectros de MS/MS dos três compostos revelam fragmentações referentes à naringenina em sua forma aglicona (271,0612 m/z) e fragmentos clássicos esperados para flavonoides. Essas fragmentações são decorrentes de reações de RDA, como 151,0030 m/z , que pode ser atribuído ao fragmento $^{1,2}A-CO$ (FABRE et al., 2001).

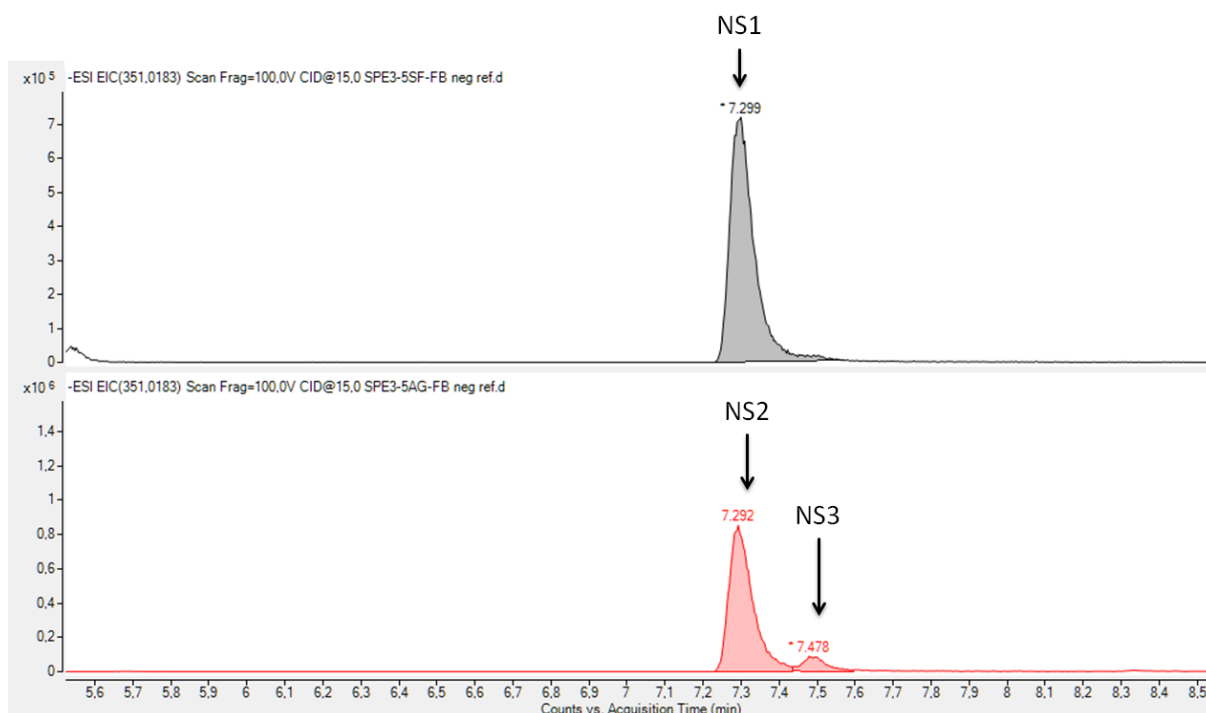


FIGURA 4.28: Cromatograma EIC para os derivados sulfatados de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* (superior) e *A. gemmatalis* (inferior), ambas alimentadas com dieta contendo naringenina.

Naringenina também foi encontrada sem modificações nas frações 70:30 dos extratos de fezes dos dois insetos (Figura A.23), assim como observado para os outros flavonoides. Os espectros de MS² mostram fragmentações características de reações do tipo RDA de flavonoides, como 115,0030 *m/z*. Outras fragmentações, como 107,0142 e 119,0508 *m/z*, já foram reportadas anteriormente na literatura em experimentos de MS/MS com naringenina.

4.5 – Ensaio enzimáticos

Os resultados obtidos durante os ensaios enzimáticos estão apresentados abaixo, sendo divididos por inseto. Com objetivo de confirmar a participação de enzimas presentes no intestino dos insetos no metabolismo de flavonoides, os metabólitos encontrados nos ensaios enzimáticos foram comparados com os presentes nas fezes. As semelhanças e diferenças entre os perfis cromatográficos dos extratos de fezes e do ensaio enzimático sugerem informações importantes sobre a localização de determinadas enzimas e seu papel no metabolismo de flavonoides para cada inseto. Esses e outros aspectos relevantes do metabolismo de flavonoides são discutidos nos tópicos seguintes.

4.5.1 – Ensaios enzimáticos com *S. frugiperda*

A Figura 4.29 mostra os metabólitos di-glicosilados de quercetina encontrados no ensaio enzimático utilizando quercetina como substrato. Os compostos foram identificados através do seu tempo de retenção, semelhante ao encontrado nas fezes do inseto. Foram utilizados também os espectros de HRMS de cada pico (Figura A.24), sendo requisito para ser considerado um di-glicosídeo os íons m/z 649,1375 ($[M+Na]^+$) ou 627,1556 ($[M+H]^+$); 465,1020 (perda de glicose); e 303,0499 (aglicona). Foram observados dois di-glicosídeos a menos no ensaio enzimático em comparação ao extrato das fezes: **D3** e **D5**. Essa observação pode ser devido à ausência de UDP-glicosiltransferases específicas no tecido utilizado para os ensaios enzimáticos.

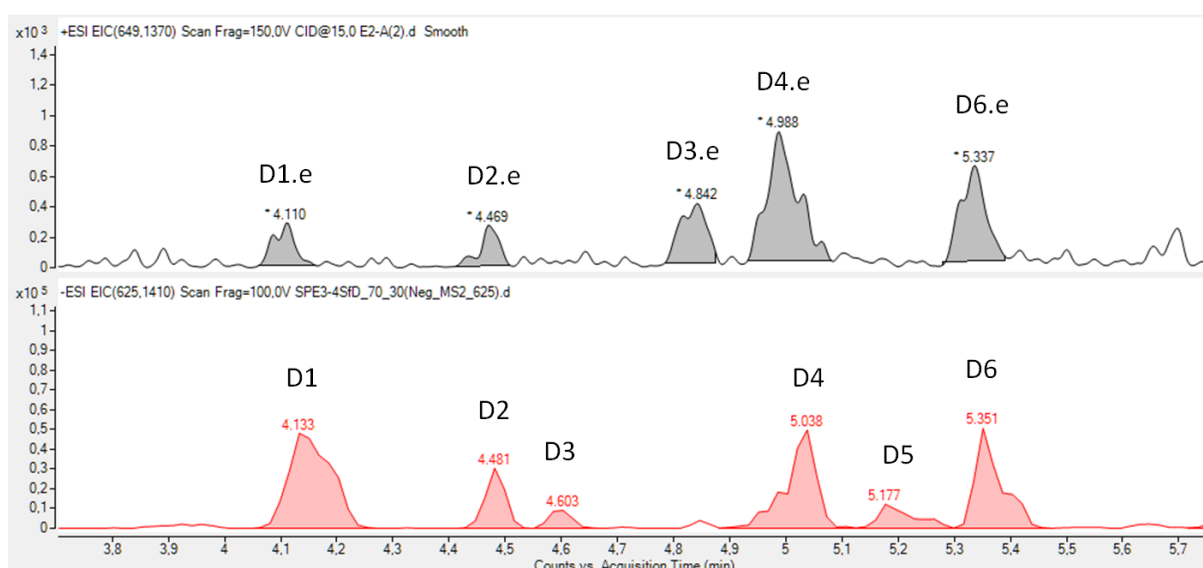


FIGURA 4.29: Cromatogramas EIC para os metabólitos di-glicosilados encontrados nos ensaios enzimáticos com *S. frugiperda* (superior) e nas fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta de quercetina (inferior). Nos ensaios enzimáticos foi utilizado quercetina e UDP-glicose como substratos. A fonte de enzimas (preparado enzimático) foi preparada com intestino de *S. frugiperda*.

A isoquercetina observada nos extratos de fezes é produzida também no ensaio enzimático *in vitro* com quercetina, apresentando os íons m/z 487,0839 e 303,0499 no espectro de HRMS do pico em 5,84 minutos (Figura A.25). O cromatograma EIC está apresentado abaixo, na Figura 4.30.

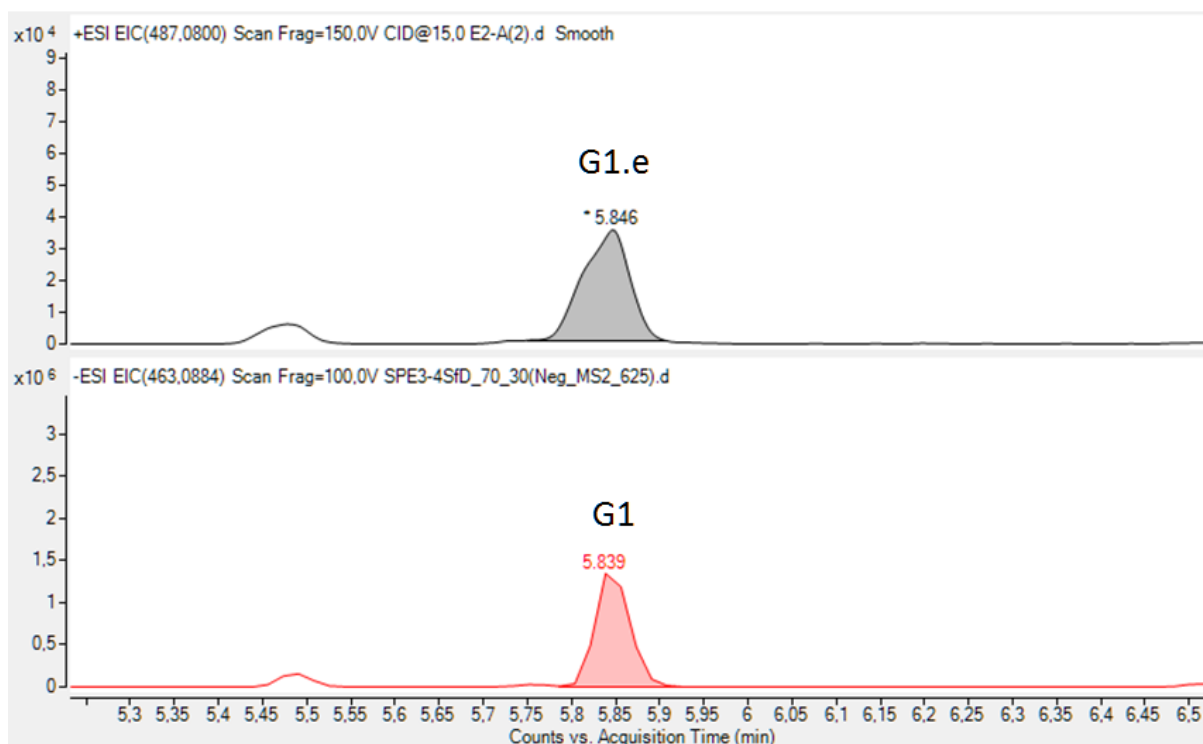


FIGURA 4.30: Cromatogramas EIC para os metabólitos de quercetina mono-glicosilados encontrados nos ensaios enzimáticos com *S. frugiperda* (superior) e nos extratos das fezes *S. frugiperda* (inferior). Nos ensaios enzimáticos foi utilizado quercetina e UDP-glicose como substratos. A fonte de enzimas (preparado enzimático) foi preparada com intestino de *S. frugiperda*.

Para os experimentos utilizando rutina como substrato, observa-se uma diferença entre os compostos encontrados nas fezes e formados nos ensaios enzimáticos em relação aos monoglicosídeos de rutina (Figura 4.31). Três glicosídeos de rutina estão presentes nos extratos de fezes e não estão no ensaio enzimático, sugerindo novamente a presença de uma UDP-glicosiltransferase em um tecido diferente do testado. Existe também a possibilidade de glucosidases estarem ativas durante o ensaio, clivando determinados glicosídeos à medida que são formados. O espectro de HRMS dos compostos em questão está contido na Figura A.26.

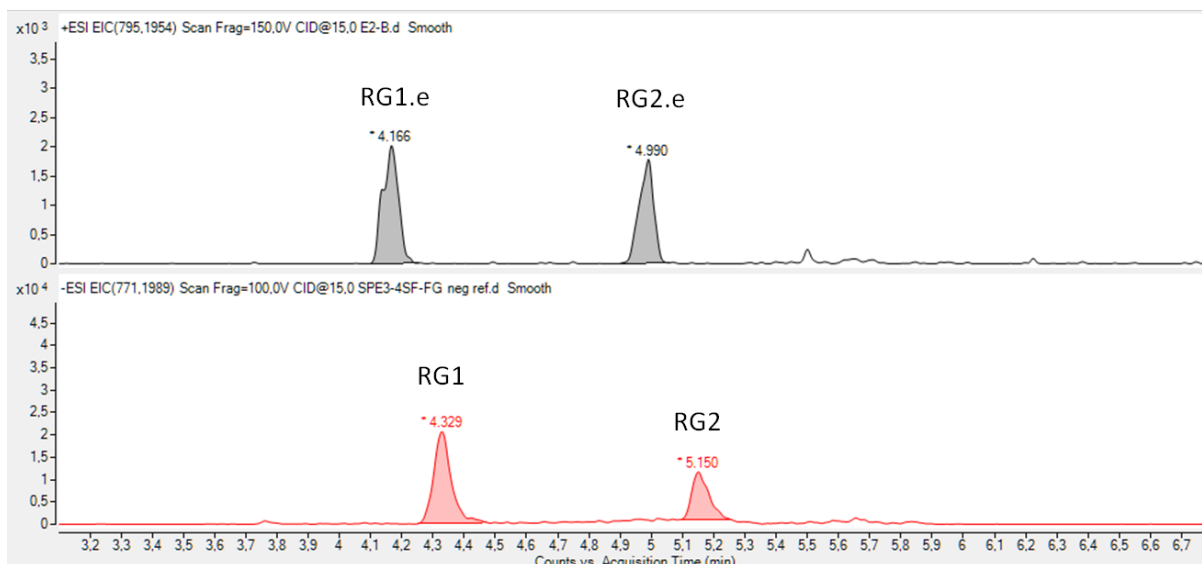


Figura 4.31: Cromatogramas EIC para os metabólitos glicosilados de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos (superior) e nas fezes de *S. frugiperda* (inferior). Nos ensaios enzimáticos foi utilizada rutina e UDP-glicose como substratos. A fonte de enzimas (preparado enzimático) foi preparada com intestino de *S. frugiperda*.

4.5.2 – Ensaios enzimáticos com *A. gemmatalis*

Na Figura 4.32 estão apresentados os mono-glicosídeos encontrados nos ensaios enzimáticos com *A. gemmatalis* utilizando quercetina como substrato. Nota-se que o perfil parece ser o mesmo do observado para as fezes, excluindo o fato de que **G3.e** tem o mesmo de tempo de retenção, sugerindo possivelmente que esse glicosídeo pode ser formado, mesmo quando não é adicionado um substrato para sulfatação enzimática. Nos espectros de HRMS dos dois compostos são observados os íons referentes ao $[M+Na]^+$ de uma quercetina glicosilada e da aglicona. Em **G3.e** é observado também 567,0415 m/z , referente ao $[M+Na]^+$ de uma quercetina sulfatada e glucosilada. Ambos os espectros de HRMS estão contidos no apêndice, na Figura A.27.

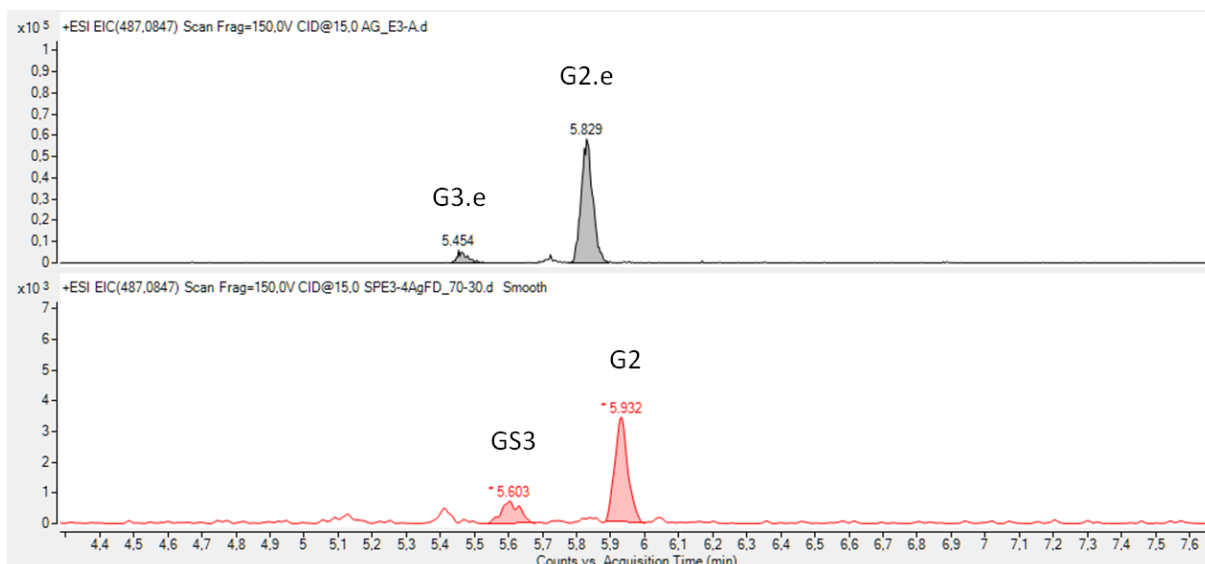


Figura 4.32: Cromatogramas de EIC para os metabólitos mono-glicosilados de quercetina encontrados nos ensaios enzimáticos (superior) e nas fezes de *A. gemmatalis* (inferior). Nos ensaios enzimáticos foi utilizado quercetina e UDP-glicose como substratos. A fonte de enzimas (preparado enzimático) foi preparada com intestino de *A. gemmatalis*.

Os metabólitos glicosilados encontrados nos ensaios com rutina (Figura 4.33) foram identificados pelo tempo de retenção semelhante ao observado nas fezes e pelos íons no espectro de HRMS referentes a $[M+Na]^+$ dessa classe de composto (Figura A.28), juntamente com a fragmentação correspondente a aglicona, aglicona glucosilada e rutina. Nota-se que **RG4.e** parece ser o mesmo composto do que **RG4**, encontrado nas fezes, enquanto **RG5.e** aparenta ser um composto diferente, não encontrado nas fezes.

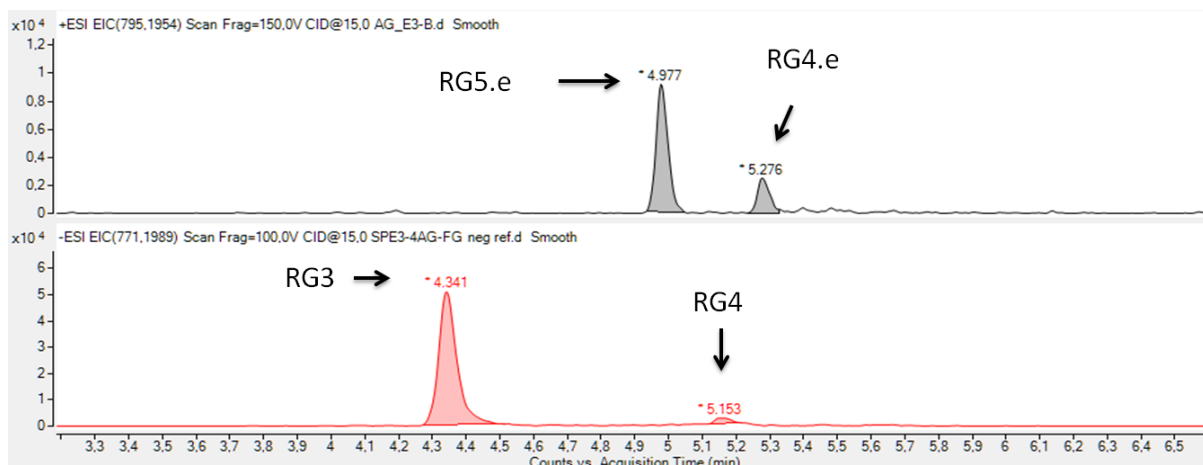


Figura 4.33: Cromatogramas de EIC encontrados para os metabólitos glicosilados de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos utilizando rutina e UDP-glicose como substratos (superior) e nas fezes de *A. gemmatalis* (inferior).

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos confirmam a ação de UDP-glicosiltransferases (que usam UDP-glicose como doador de glicose) no intestino dos insetos, gerando grande parte dos metabólitos observados nas fezes.

4.5.3 - Reações e enzimas envolvidas

UDP-glicosiltransferases (UGTs) são conhecidas em vários organismos, incluindo insetos, onde podem desempenhar funções relacionadas a regulação de compostos endógenos, reconhecimento de feromônios e detoxificação de xenobióticos. (AHN et al., 2012). Todas as famílias de UGTs já reportadas em insetos apresentam alguns domínios característicos, que fornecem informações sobre sua estrutura. São proteínas ligadas à membrana, ancoradas no retículo endoplasmático com seu domínio catalítico voltado para o lúmen (AHN et al., 2012). Contém ainda uma pequena cauda presente na parte de fora da organela, ligada à proteína através de seu domínio transmembrana, altamente hidrofóbico. Por estarem ancoradas na camada fosfolipídica, essas enzimas conseguiriam funcionalizar os flavonoides logo após sua entrada na célula, assim como atuar em conjunto com transportadores proteicos presentes na membrana, ajudando a direcionar o composto até o transportador devido a sua possível proximidade.

A glicosilação da quercetina parece acontecer preferencialmente na posição 3, já que o único mono-glicosídeo observado nas fezes foi a isoquercetina, que possui uma glicose nessa posição. Esse fato não impede que a mesma enzima glicosile o composto em outras posições, evidenciado pela presença de di- e tri-

glicosídeos, assim como a rutina e naringenina glicosilada. Mesmo tri-glicosilada, a quercetina ainda apresenta mais dois possíveis sítios para a O-glicosilação, porém não foram observadas moléculas com mais de três glicoses funcionalizadas. A naringenina também sofre efeito semelhante, mesmo com 3 sítios para a glicosilação, não foram observados compostos com mais de dois açúcares.

A glicosilação regioseletiva de quercetina já foi observada anteriormente em Lepidoptera. *Bombyx mori* glicosila a quercetina em sua dieta preferencialmente na posição 5, utilizando-a posteriormente em seu casulo, provavelmente para proteção contra radiação UV (HYRAYAMA et al., 2008; TAMURA et al., 2002). Para compostos semelhantes, já foi reportada também a glicosilação estereoespecífica. Espécies do gênero *Spodoptera* conseguem produzir somente o diastereoisômero 2S de glicosídeos de benzoxazinoides, impedindo que as glicosidases da planta presentes em seu intestino no momento da alimentação voltem a clivar esse metabólito, que gera espécies tóxicas quando não conjugado com um açúcar (WOUTERS et al., 2014).

Além de fornecer informações sobre a regioseletividade da enzima, a observação de que o único mono-glicosídeo formado em experimentos que quercetina é isoquercetina pode indicar a importância da posição 3 livre para a toxicidade do composto. Imagina-se que essa seja uma das modificações primárias realizadas no esqueleto das agliconas, pela sua alta concentração nas fezes, indicada por um pico intenso no cromatograma (Figura 4,16). A literatura mostra que a atividade anti-oxidante de flavonoides diminui com a conjugação de um açúcar na posição 3, seja pela perda da conjugação e capacidade de doar um próton exemplificada na Figura 1.4 - 3, ou pela conjugação menos efetiva entre os anéis B e C, gerada por torções entre esses dois anéis (GRZEGORZEWSKI , 2010). Esse fato pode ser extrapolados para as propriedades pró-oxidantes, uma vez que em altas concentrações radicais mais estáveis seriam capazes de propagar o estresse oxidativo por mais tempo e em mais regiões da célula.

A metilação provavelmente acontece nas hidroxilas 3' e 4' do anel B, responsáveis em grande parte pelas propriedades relacionadas a radicais livres dos flavonoides (GRZEGORZEWSKI, 2010; PROCHAZKOVA et al., 2011). Se a metilação ocorrer nas posições 3' ou 4', o anel B perde sua capacidade de formação de uma *orto*-quinona, o que contribui para uma diminuição da capacidade do

composto de estabilizar um radical e doar prótons radicalares. Já foi reportada a metilação de quercetina em células humanas, supostamente com o propósito de regular as concentrações de radicais livres dentro da célula (SPENCER et al., 2003). É conhecido também que flavonoides que não possuem hidroxilas em posição *orto* no anel B causam menos dano a insetos herbívoros do que seus análogos com essas funções (ELLIGER et al., 1980). Apesar de essas afirmações fazerem sentido do ponto de vista biológico, os dados obtidos no presente trabalho não conseguem comprovar que a metilação acontece nas posições sugeridas.

A presença de derivados sulfatados, assim como metilados e glicosilados (**QS1**, **QM1**, **G1**) nas fezes sugerem que as enzimas correspondentes aceitam a aglicona como substrato. Rutina e os di e tri-glicosídeos não são fosfatados nem sulfatados, provavelmente por essas enzimas não aceitarem substratos diglicosilados. A presença de metabólitos sulfatados de quercetina nas amostras de rutina sugere a ação de glicosidases, uma vez que não foram observados derivados sulfatados ou fosforilados de rutina. Os derivados de quercetina podem ser também derivados das impurezas presentes no padrão de rutina utilizado nos experimentos, que contém quercetina em quantidades mínimas. A sulfatação de flavonoides já foi demonstrada em células de ratos e humanos, como parte do metabolismo desses compostos. O flavonóide glicosilado hesperidina é sulfatado e glicosilado em células humanas, provavelmente com o objetivo de promover seu transporte ativo através de proteínas do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) (ZHU et al., 2010; BRAND et al., 2008).

Derivados de quercetina somente fosforilados não foram observados, dando a entender que a fosforilação é uma modificação posterior à glicosilação, acontecendo no esqueleto da aglicona e não no açúcar, pela presença do fragmento *m/z* 381,0017 no MS/MS do íon molecular do glicosídeo fosfatado (*m/z* 543,0450). Esses fatos sugerem que a enzima responsável pela fosforilação aceita somente substratos glicosilados, apesar de fosforilar o glicosídeo no esqueleto da aglicona. São raros os exemplos de fosforilação de compostos provenientes de plantas por insetos, sendo o mais recente por Boeckler e colaboradores (BOECKLER et al., 2016). Não se sabe ainda os motivos da realização desse tipo de modificação. Sugere-se que aconteçam para aumentar a polaridade do flavonoide, dificultando

sua permeabilidade em membranas, como também ser substrato para transportadores proteicos.

4.6 – *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*: diferenças na relação com flavonoides presentes na dieta.

Sabe-se que *A. gemmatalis* prefere plantas mais velhas quando comparada a *S. frugiperda*, que consegue atacar plantas de soja em qualquer estágio de desenvolvimento (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012). É conhecida também a variação nas concentrações de glicosídeos e agliconas nas folhas da soja, sendo maior a concentração de glicosídeos nos estágios mais avançados do desenvolvimento da soja (SONG et al., 2014; GRAHAM, 1991). A espécie *A. gemmatalis* produz dois di-glicosídeos a menos que *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta contendo quercetina, possivelmente indicando que *A. gemmatalis* tem capacidade reduzida de lidar com flavonoides em sua forma aglicona, baseando-se somente na quantidade de metabólitos formados. A real capacidade de detoxificação de cada inseto irá depender de fatores quantitativos de cada rota utilizada. Com naringenina na dieta, os insetos produzem a mesma quantidade de metabólitos somente glicosilados ou di-glicosilados, enquanto *S. frugiperda* produz 3 glicosídeos sulfatados e 2 fosfatados e *A. gemmatalis* não produz nenhum metabólito dessas classes. Nenhum dos dois insetos produzem metabólitos metilados de naringenina. Para rutina, *A. gemmatalis* produz uma quantidade inferior de derivados de quercetina quando comparada a *S. frugiperda* (1 fosfo-glicosídeo e 2 sulfo-glicosídeos), porém os dois insetos produzem a mesma quantidade de metabólitos glicosilados e metilados. Já foi reportada a toxicidade superior de quercetina em relação à rutina em *A. gemmatalis* (PIUBELLI et al., 2005, GAZZONI et al., 1997). Nesse trabalho, observou-se uma toxicidade de quercetina em *A. gemmatalis* maior do que em *S. frugiperda*. A tabela 4.11 sumariza as diferenças encontradas na quantidade e variedade de metabólitos de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* encontradas nesse trabalho.

Tabela 4.11: Quantidade e variedade de metabólitos encontrados nos extratos de fezes de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* ingerindo dietas contendo quercetina, naringenina ou rutina.

	<i>S. frugiperda</i>	<i>A. gemmatalis</i>
Tri-glicosídeos		
Quercetina	3	3
Rutina	-	-
Naringenina	-	-
Di-glicosídeos		
Quercetina	6	4
Rutina	-	-
Naringenina	3	3
Metil-di-glicosídeos		
Quercetina	2	1
Rutina	-	-
Naringenina	-	-
Fosfo-glicosídeos		
Quercetina	2	-
Rutina	1	-
Naringenina	2	-
Sulfo-glicosídeos		
Quercetina	3	3
Rutina	3	1
Naringenina	3	-
Mono-glicosídeos		
Quercetina	1	1
Rutina	2	2
Naringenina	2	2
Metil-mono-glicosídeos		
Quercetina	2	1
Rutina	-	-
Naringenina	-	-
Derivados sulfatados		
Quercetina	1	1
Rutina	-	-
Naringenina	1	2
Derivados sulfo-metilados		
Quercetina	1	1
Rutina	-	-
Naringenina	-	-
Derivados metilados		
Quercetina	1	1
Rutina	1	1
Naringenina	-	-
Derivados metil-sulfo-glicosilados		
Quercetina	1	1
Rutina	-	-
Naringenina	-	-

A. gemmatalis também não produziu nenhum derivado fosfatado de flavonoide ou flavonona em nenhum experimento. Os glicosídeos sulfatados de quercetina que aparecem nas suas fezes aparentam também ser diferentes dos observados em *S. frugiperda*, sendo possivelmente sulfatados no açúcar, enquanto que *S. frugiperda* produziu metabólitos sulfatados na aglicona quando alimentada com dietas contendo quercetina e naringenina.

O metabolismo de rutina é bem semelhante nos insetos estudados, porém observa-se dois derivados de quercetina glicosilados e sulfatados em *S. frugiperda* (**QGS1-QGS2**) que não estavam presentes nos extratos de fezes de *A. gemmatalis*, o que poderia ser considerado um reflexo da possível capacidade reduzida de lidar com agliconas de *A. gemmatalis*. Nota-se que quando é administrada rutina, um flavonoide glicosilado, *A. gemmatalis* produz a mesma quantidade de metabólitos glicosilados e metilados que *S. frugiperda*, provavelmente porque os dois insetos conseguem lidar de maneira similar com o composto (enquanto não ocorre hidrólise do rutinósídeo), possivelmente ajudando a explicar seus hábitos alimentares.

Pelos dados mostrados aqui e com precedentes da literatura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; PIUBELLI et al., 2005; GAZZONI et al., 1997), assume-se que flavonoides glicosilados são menos tóxicos que suas agliconas correspondentes, quando alimentados em dietas artificiais para os insetos estudados. Dessa maneira, o inseto parece glicosilar, fosforilar e sulfatar os flavonoides para diminuir essa toxicidade através dos mecanismos já descritos acima. A maior quantidade de metabólitos observada nas fezes dos dois insetos pode ser um reflexo da maior toxicidade encontrada para quercetina. *S. frugiperda* aparenta ter uma capacidade maior que *A. gemmatalis* de lidar com flavonoides como um todo, por produzir uma maior variedade de metabólitos.

4.7 – Conclusões

Como visto, flavonoides são glicosilados, metilados, sulfatados e fosforilados. Com exceção da metilação, todas as outras reações contribuem para um aumento na polaridade dos flavonoides, diminuindo sua lipofilicidade e conseqüentemente o transporte passivo através de membranas, estratégia já observada na detoxificação de outros compostos insetos (BOECKLER 2016 et al., AHN et al., 2012). Devido as diferenças observadas no metabolismo dos diferentes flavonoides utilizados nos

experimentos apresentados aqui, sugere-se que as posições 3 e 4' tem importância fundamental na maneira como os compostos serão metabolizados. Quando não estão presentes (naringenina) os insetos produzem uma quantidade menor de metabólitos assim como uma menor variedade. Quando a posição 3 já se encontra glicosilada, como na rutina, é observada também uma menor quantidade de metabólitos, quando comparados aos metabólitos de quercetina, assim como menor toxicidade nos bio-ensaios.

Procurando entender o processo como um todo, propõe-se que exista uma UDP-glicosiltransferase pouco seletiva que utilize como substratos a quercetina aglicona, mono- e di-glicosídeos, derivados metilados, sulfatados e fosforilados. Por outro lado, o conjunto de metabólitos observados pode ser originado pela ação de várias UDP-glicosiltransferases com seletividades diferentes frente a cada classe de compostos. A partir dos dados obtidos, ainda não está claro como essas reações estão organizadas nas rotas metabólicas do inseto, ou seja, se a quercetina primeiro é metilada para depois ser sulfatada, ou se ambas sequências ocorrem simultaneamente. A elucidação estrutural dos metabólitos e investigação da regioquímica dessas reações, bem como a realização de novos ensaios enzimáticos, nos permitirá um melhor entendimento sobre a arquitetura das rotas metabólicas de flavonoides nesses insetos.

Abaixo estão resumidas as demais conclusões que este trabalho pode fornecer:

- Tanto rutina quanto quercetina foram tóxicas para *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, alterando a massa larval e a duração dos estágios de vida, principalmente. Para *S. frugiperda*, foi possível observar um comportamento dose-dependente para a toxicidade dos compostos.
- *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* glicosilam os flavonoides administrados na dieta, provavelmente com o objetivo de diminuir sua toxicidade através do aumento de polaridade desses compostos. Os insetos também metilam quercetina e rutina, provavelmente com o objetivo de reduzirem a capacidade dos flavonoides de gerarem espécies radiculares.
- Ambos os insetos sulfatam a quercetina e naringenina em sua forma aglicona, formando ainda derivados glicosilados, metilados e sulfatados, exceto para

naringenina. *S. frugiperda* ainda pode fosforilar a aglicona, formando derivados fosfo-glicosilados. Ambos os insetos parecem sulfatar os flavonoides glicosilados no açúcar, enquanto *S. frugiperda* sulfata também os glicosídeos no esqueleto aglicona. Hipoteticamente, essas modificações são realizadas objetivando o aumento de polaridade e para facilitar a excreção dos flavonoides.

- O fato de não serem observados metabólitos metilados de naringenina, assim como uma quantidade reduzida de outros metabólitos, sugere a importância das posições 3' e 4' para a metabolização dos flavonoides, assim como a presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C.
- São gerados também isômeros de posição dos di- e tri-glicosídeos, como também dos glicosídeos metilados e sulfatados. A presença desses isômeros pode ser relacionada à conjugação da glicose nas diferentes posições dos flavonoides.
- A menor quantidade de metabólitos de quercetina e naringenina produzida por *A. gemmatilis* pode ser um indicativo de sua capacidade reduzida de metabolizar agliconas, ajudando a explicar sua preferência por folhas mais velhas da planta.
- Os glicosídeos observados nos extratos de fezes foram observados também em ensaios *in vitro* com UDP-glicose, confirmando que UDP-glicosiltransferases presentes no tecido do intestino dos insetos são as enzimas responsáveis pela produção desses metabólitos.
- Experimentos semelhantes com outros flavonoides são necessários para melhor compreender a influência da estrutura dos flavonoides no seu metabolismo e a seletividade das enzimas envolvidas.
- A elucidação estrutural dos metabólitos observados também é importante para um maior entendimento dos mecanismos envolvidos, uma vez que revela as posições em que as enzimas podem atuar nos flavonoides, entre outros aspectos relevantes.

5 – Referências

- AGRAWAL, A. A.; PETSCHENKA, G.; BINGHAM, R. A.; WEBER, M. G. & RASMANN, S. "Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions". *New Phytologist*, **194** : 28-45, 2012.
- AHMAD, S.; PRISTOS, C. A.; BOEWN, S. M.; KIRKLAND, K. E.; BLOMQUIST, G. J. & PARDINI, R. S. "Activities of enzymes that detoxify superoxide anion and related toxic oxyradicals in *Trichoplusia ni*". *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **6** : 85-96, 1987.
- AHN, S.; VOGEL, H. & HECKEL, D. G. "Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **42** : 133 – 147, 2012.
- AMIC, D. & LUCIC, B. "Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18** : 28–35, 2010.
- AMIC, D.; BELO, D., RASTIJA, V.; LUI, B. & TRINAJSTI, N. "SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids". *Current Medicinal Chemistry*, **14** : 827-845, 2007.
- APPEL, H.M. "The chewing herbivore gut lumen: physicochemical condition and their impact on plant nutrients, allelochemicals and insect pathogens". IN: *Insect-Plant Interactions*. E. A. BERNAYS (Ed.). Boca Raton, CRC Press, 1993. p. 209-223.
- BARBEHENN, R.; CHEEK, S.; GASPERUT, A.; LISTER, E. & MABEN, R. "Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars". *Journal of Chemical Ecology*, **31** : 969-988, 2005.
- BEDE, J. C.; MUSSER, R. O.; FELTON, G. W. & KORTH, K. L. "Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis". *Plant Molecular Biology*, **60** : 519–531, 2006.
- BERNAYS, E. A. & CHAPMAN, R.F., "Plant secondary compounds and grasshoppers: beyond plant defenses". *Journal of Chemical Ecology*, **26** : 1773–1794, 2000.

- BERNAYS, E. A. & CHAPMAN, R. F. Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. 1a ed. Nova Iorque, Chapman & Hall, 1994. p. 4
- BESERRA, E. B.; DIAS, C. T. S. & PARRA, J. R. "Distribution and natural parasitism of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at different phenological stages of corn". Florida Entomologist, **85** : 588-593, 2002.
- BI, J. L. & FELTON, G. W., "Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance". Journal of Chemical Ecology, **21** : 1511-1530, 1995.
- BOECKLER, G. A.; PAETZ, C.; FEIBICKE, P.; GERSHENZON, J. & SYBILLE, B. "Metabolism of poplar salicinoids by the generalist herbivore *Lymantria dispar* (Lepidoptera)". Insect Biochemistry and Molecular Biology, **78** : 39-49, 2016.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C. & SARAN, M. "Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies". Methods in Enzymology, **186** : 343-355, 1990.
- BRAND, W.; VAN DER WEL, P. A. I.; REIN, M. J.; BARRON, D.; WILLIAMSON, G. VAN BLADEREN, P. J. & RIETJENS, I. M. C. M. "Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers". Drug Metabolism and Disposition, **36** : 1794-1802, 2008.
- BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; XAVIER, M. F. C. & CARVALHO, M. M. "*Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) parasitism on eggs of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Erebidae) compared with its natural host *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". Annals of the Entomological Society of America, **107** : 79-808, 2014.
- BURGHARDT, F.; KNUTTEL, H.; BECKER, M. & FIEDLER, K. "Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Polyommatus icarus*) butterflies to mate-searching males". Naturwissenschaften, **87** : 304–307, 2000.
- BURGHARDT, F.; PROKSCH, P. & FIELDER, K. "Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Polyommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval host plant, sex and body size". Biochemical Systematic Ecology, **29** : 875–889, 2001.

CAPINERA, J. "Feature creatures: fall armyworm." Entomology & Nematology, disponível em (http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm#life), acessado dia 07/08/19.

CHAN, T.; GALATI, G. & O'BRIEN, P. J. "Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones or flavanones". Chemico-Biological Interactions, **122** : 15–25, 1999.

CUI, B.; HUANG, X.; LI, S.; HAO, K.; TU, X. & PANG, B. & ZHANG, Z. "Quercetin affects the growth and development of the grasshopper *Oedaleus asiaticus* (Orthoptera: Acrididae)". Journal of Economic Entomology, 112 (3): 1175-1182, 2019.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K. & HOSTETTMANN, K. "On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS". Phytochemical Analysis, **17** : 337-343, 2006.

DANG, L. & VAN DAMME, E. J. M. "Toxic proteins in plants". Phytochemistry, **117** : 51-64, 2015.

DESPRÉS, L.; DAVID, J .P. & GALLET, C. "The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals". Trends in Ecology and Evolution, **22** : 298-307, 2007.

EL AMRANIM, F. B. A.; PARELLO, L.; REAL, J. A.; ALVAREZ, M. G.; ALZUET, G.; BORRÁS, J.; GRANDA, S. G. & BERNARDO, J. M. "Oxidative DNA cleavage induced by an iron(III) flavonoid complex: synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis(flavonolato)(methanol) iron(III) complex". Journal of Inorganic Biochemistry, **100** : 1208–1218, 2006.

ELLIGER, C. A.; CHAN, B. C. & WAISS, A. C. "Flavonoids as larval growth inhibitors" Naturwissenschaften, **67** : 358-360, 1980.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E. & QUETIN-LECLERCQ, J. "Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry". Journal of the American Society of Mass Spectrometry, **12** : 707-715, 2001.

- FEENY, P.; SACHDEV, K.; ROSENBERRY, L. & CARTER, M. "Luteolin 7-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucoside and trans-chlorogenic acid: oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly". *Phytochemistry*, **27** : 3439-3448, 1988.
- FELTON, G. W.; SUMMERS, C. B. & MUELLER, A. J. "Oxidative reponse in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-corned alfalfa hopper". *Journal of Chemical Ecology*, **20** : 639-651, 1994.
- FIRUZI, O.; MLADENKA, P.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G. & SASO, L. "Hypochlorite scavenging activity of flavonoids". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56** : 801-807, 2004.
- FRANCO, A. A.; QUEIROZ, M. S.; PERES, A. R.; ROSA, M. E.; CAMPOS, Z. R. & CAMPOS, A. R. "Resistência de cultivares de soja a *Anticarsia gemmatalis*". *Revista Inova Ciência & Tecnologia*, **2** : 7-13, 2016.
- GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J. X. & O'BRIEN, P. J. "Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics". *Toxicology*, **177** : 91-104, 2002.
- GALATI, H.; CHAN, T.; WU, B. & O'BRIEN, P. J. "Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids" *Chemical Research in Toxicology*, **12** : 521-525, 1999.
- GAZZONI, D. L.; HOLSMEYER, A. & HOFFMAN-CAMPO, C. B. "Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **32** : 673-681, 1997.
- GRAHAM, L. T.; KIM, J. E. & GRAHAM, M. Y. "Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*". *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **3** : 157-166, 1990.
- GRAHAM, L. T. "Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed root exudates". *Plant Physiology*, **95** : 594-603, 1991.
- GRZEGORZEWSKI, F. Influence of Non-Thermal Plasma Species on the Structure and Functionality of Isolated and Plant-based 1,4-Benzopyrone Derivatives and Phenolic Acids. Berlin, Department of Food Chemistry and Food Analytics - Technischen Universität Berlin, 2011. Tese de Doutorado.

HILKER, M. & MEINERS, T. "How do plants "notice" attack by herbivorous arthropods?". *Biological Reviews*, **85** : 267–280, 2010.

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*". **69** : 1141-1149, 2008.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBONE, 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*, **98**: 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L. & OLIVEIRA, E. B. "Pragas que atacam plântulas, hastes e pecíolos da soja". IN: Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. & MOSCARDI, F. (Eds.). Londrina, Embrapa Soja, 2012.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; NETO, J. A. R.; OLIVEIRA, N. C. N. & OLIVEIRA, L. J. "Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **41** : 1453-1459, 2006.

IOANNIDES, C. "Xenobiotic metabolism: an overview. IN: Enzyme Systems that Metabolize Drugs and Other Xenobiotics". Ioannides, C., (Ed.). Nova Iorque, John Wiley & Sons, 2001, p. 1-32.

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*, **71** : 37-48, 2016.

JONES, C. G. & FIRN, R. D. "On the evolution of plant secondary chemical diversity". *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, **333** : 273-280, 1991.

JONES, P. M. & GEORGE, A. M. "The ABC transporter structure and mechanisms: perspectives and recent research". *Cellular and Molecular Life Sciences*, **8** : 682-700, 2004.

KAHN, Z. R.; WARD, J. T. & NORRIS, D. M. "Role of trichomes in soybean resistance to cabbage looper, *Trichoplusia ni*". *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **42** : 109-117, 1986.

KENNEDY, C. J. & TIERNEY, K. B. "Xenobiotic protection/resistance mechanisms in organisms". In: *Environmental Toxicology: Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science*. Laws, E.A. (Ed.). Nova Iorque: Springer, 2012. p. 689-721.

LAUGHTON, M.; HALLIWELL, B.; EVANS, P. J. & HOULT, J. R. "Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin". *Biochemical Pharmacology*, **7** : 2859-2865, 1989.

LEHANE, M. J. "Peritrophic matrix structure and function". *Annual Review of Entomology*, **42** : 525-50, 1997.

LEVIN, D. A. "The role of trichomes in plant defense". *The Quarterly Review of Biology*, **48** : 3-15, 1973.

LI, X.; SCHULER, M. A. & BERENBAUM, M. R. "Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics". *Annual Review of Entomology*, **52** : 231-253, 2007.

MARQUES, T. R.; CAETANO, A. A.; ALVES, D. S.; RAMOS, V. O.; SIMÃO, A. A.; CARVALHO, G. A. & CORRÊA, A. D. "*Malpighia emarginata* DC. bagasse acetone extract: phenolic compounds and their effect on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Chilean Journal of Agricultural Research*, **76** : 55-61, 2016.

MAGALHÃES, M. N. & LIMA, A. C. P. *Noções de Probabilidade e Estatística*. 7 ed. Editora da Universidade de São Paulo, 2015. p. 269.

MCNAB, H.; FERREIRA, E.S.B.; HULME, A. N. & QUY, A. "Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow dye flavonoids—an isotopic labelling study". *International Journal of Mass Spectrometry*, **284** : 57-65, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Projeções do Agronegócio*. Coordenação-Geral de Estudos e Análises – CGEA, Brasília – DF, 2018.

- MITHÖFER, A. & BOLAND, W. "Plant defense against herbivores: chemical aspects". Annual Review of Plant Biology, **63** : 431-450, 2012.
- NAPAL, G. N. D. & PALACIOS, S. M. "Bioinsecticidal effect of the flavonoids pinocembrin and quercetin against *Spodoptera frugiperda*". Journal of Pest Science, **88** : 629–635, 2015.
- NEALIS, V. G. & NAULT, J. R. "Seasonal changes in foliar terpenes indicate suitability of douglas-fir buds for western spruce budworm". Journal of Chemical Ecology, **31** : 683-696, 2005.
- NIEMEYER, H. M. "Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one: key defense chemicals of cereals". Journal of Agricultural and Food Chemistry, **57** : 1677-1696, 2009.
- PENTZOLD, S.; ZAGROBELNY, M. & BAK, F. R. "How insects overcome two-component plant chemical defence: plant β -glucosidases as the main target for herbivore adaptation". Biological Reviews, **89** : 1-10, 2013.
- PEREIRA, L. G. B.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. & MALASPINA, O. "Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda*". Pest Management Science, **58** : 503-507, 2002.
- PICHERSKY, E. & LEWINSOHN, E. "Convergent evolution in plant specialized metabolism". Annual Review of Plant Biology, **62** : 549-566, 2011.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H. & OLIVEIRA, M. C. N. "Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?". Journal of Chemical Ecology, **31** : 1509-1525, 2005.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; FRANCHINI, J. C. & LARA, F. M. "Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference". Journal of Chemical Ecology, **29** : 1223-1233, 2003.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVA, I. & WIHELMOVÁ, N. "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids". Fitoterapia, **82** : 513–523, 2011.

- RAMACHANDRAN, R.; NORRIS, D. M.; PHILLIPS, J. K.; & PHILLIPS, T. W. "Volatiles mediating plant-herbivore-natural enemy interactions: soybean looper frass volatiles, 3-octane and guaiacol, as kairomones for the parasitoid *Microplitis demolitor*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** : 2310-2317, 1991.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. & PAGANA, G. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radical Biology & Medicine*, **20** : 933-956, 1996.
- ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; AROLDI, C.; VAZZANA, C. & HEIMLER, D. "Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** : 5301–5306, 2003.
- SALUNKE, B. K.; KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; UPASANI, S. M. & MAHESHWARI, V. L. "Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes". *Crop Protection*, **24** : 888-893, 2005.
- SALVADOR, M. C. Efeito de Genótipos de Soja e de Flavonóides na Biologia e no Intestino Médio de *Anticarsia gemmatalis* Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, 2008. Dissertação mestrado.
- SALVADOR, M. C.; BOIÇA, A.; OLIVEIRA, M. C. N.; GRAÇA, J. P.; SILVA, D. M. & HOFFMANN-CAMPO, C. B. "Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)?" *Neotropical Entomology*, **39** : 2010.
- SELIN-RANI, S.; SENTHIL-NATHAN, S.; THANIGAIVEL, A.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; EDWIN, E.; PONSANKAR, A.; LIJA-ESCALINE, J.; KALAIVANI, K.; ABDEL-MEGEED, A.; HUNTER, W. B. & ALESSANDRO, T.R. "Toxicity and physiological effect of quercetin on generalist herbivore, *Spodoptera litura* Fab. and a non-target earthworm *Eisenia fetida* Savigny". *Chemosphere*, **165** : 257 - 267, 2016.
- SHUKLE, R. H. & MURDOCK, L. L. "Lipoxygenase trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)". *Environmental Entomology*, **12** : 787-791, 1983.

- SIMMONDS, M. S. J. "Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition". *Phytochemistry*, **56** : 245-252, 2001.
- SIMMONDS, M.S.J. "Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge". *Phytochemistry*, **64** : 21-30, 2003.
- SILVA, T. R. F. B.; ALMEIDA, A. C. S.; MOURA, R. L.; SILVA, A. R.; FREITAS, S. S. & JESUS, F. G. "Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Acta Scientiarum*, **38** : 65-170, 2017.
- SMITH, C. M. & GILMAN, D. F. "Comparative resistance of multiple insect-resistant soybean genotypes to the soybean looper". *Journal of Economic Entomology*, **74** : 400-403, 1981.
- SPENCER, J. P. E.; KUHNLE, G. G .C.; WILLIAMS, R. J. & RICE-EVANS, C. "Intracellular metabolism and bioactivity od quercetin and its *in vivo* metabolites". *Biochemistry Journal*, **372** : 173-181, 2003
- SONG, H.; RYU, H. W.; LEE, K. J. JEONG, I. Y.; KIM, D. S. & OH, S. "Metabolomics investigation of flavonoid synthesis in soybean leaves depending on the growth stage". *Metabolomics*, **10** : 833-841, 2014.
- SOUZA, B. H. S. Fatores e Mecanismos que Influenciam a Resistência em Soja a *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 2014. Tese de doutorado.
- SUBRAMANIAN, S.; STACEY, G. & YU, O. "Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*". *The Plant Journal*, **48** : 261-273, 2006.
- SUN, C.; FU, J.; CHEN, J.; JIANG, L. & PAN, Y. "On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures". *Journal of Separation Science*, **33** : 1018–1023, 2010.
- TAMURA, Y.; NAKAJIMA, K.; NAGAYASU, K. & TAKABAYASHI, C. "Flavonoid 5-glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*". *Phytochemistry*, **59** : 275–278, 2002.

TREUTTER, D. "Significance of flavonoids in plant resistance: a review". *Environmental Chemistry Letters*, **4** :147–157, 2006.

WILBERT. S. M.; SCHEMSKET, D. W. & BRADSHAW, H. D. "Floral anthocyanins from two monkeyflower species with different pollinators". *Biochemical Systematics and Ecology*, **25** : 437-443, 1997.

WILMDS, L. C.; KLEINJANS, J. C. S.; MOONEN, E. J. C. & BRIEDEM J. J. "Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro". *Toxicology in Vitro*, **22** : 301–307, 2008.

WITTSTOCK, U. & GERSHENZON, J. "Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens". *Current Opinion in Plant Biology*, **5** : 300-307, 2002.

WOUTERS, F. C.; REICHEL, M., GLAUSER, G.; BAUER, E., ERB, M. GERSHENZON, J. & VASSÃO, D. G. "Regucosylation of the benzoxazinoid DIMBOA with inversion of stereochemical configuration is a detoxification strategy in Lepidopteran herbivores". *Angewandte*, **126** : 11502-11506, 2014.

WOUTERS, F. C.; GERSHENZON, J. & VASSÃO, D. G. "Benzoxazinoids: reactivity and modes of action of a versatile class of plant chemical defenses". *Journal of Brazilian Chemical Society*, **8** : 1379-1397, 2016.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; TSAI, H. L. & HUANG, S. L. "Pro-oxidative properties of flavonoids in Human Lymphocytes". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **67** : 1215-1222, 2003.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M. & MURAKAMI, K. "Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA". *Molecular Genetics and Metabolism*, **68** : 468–472, 1999.

ZHOU, Y.; LOU, S.; YI, T.; LI, C.; LUO, Q.; HUA, J.; LIU, Y. & HONG "Secondary metabolites from glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59** : 6004–6010, 2011.

Apêndice

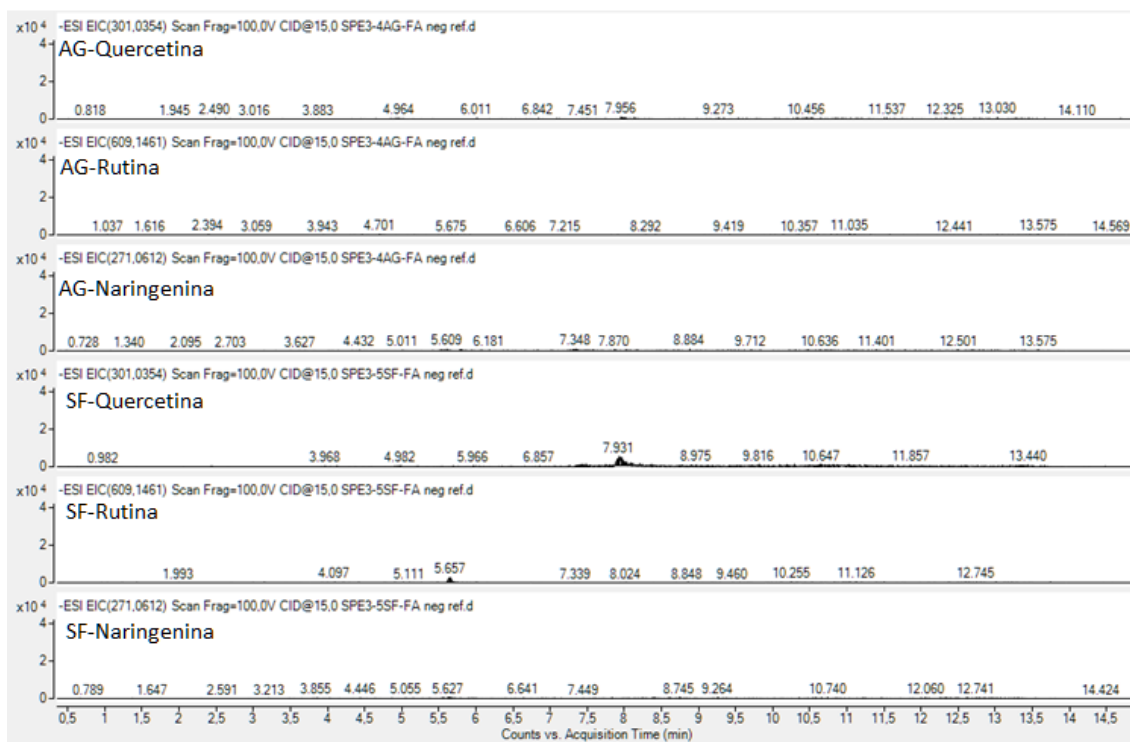


FIGURA A.1: Cromatogramas de EIC das fezes dos grupos controle para os insetos estudados. (SF: *Spodoptera frugiperda*; AG: *Anticarsia gemmatalis*)

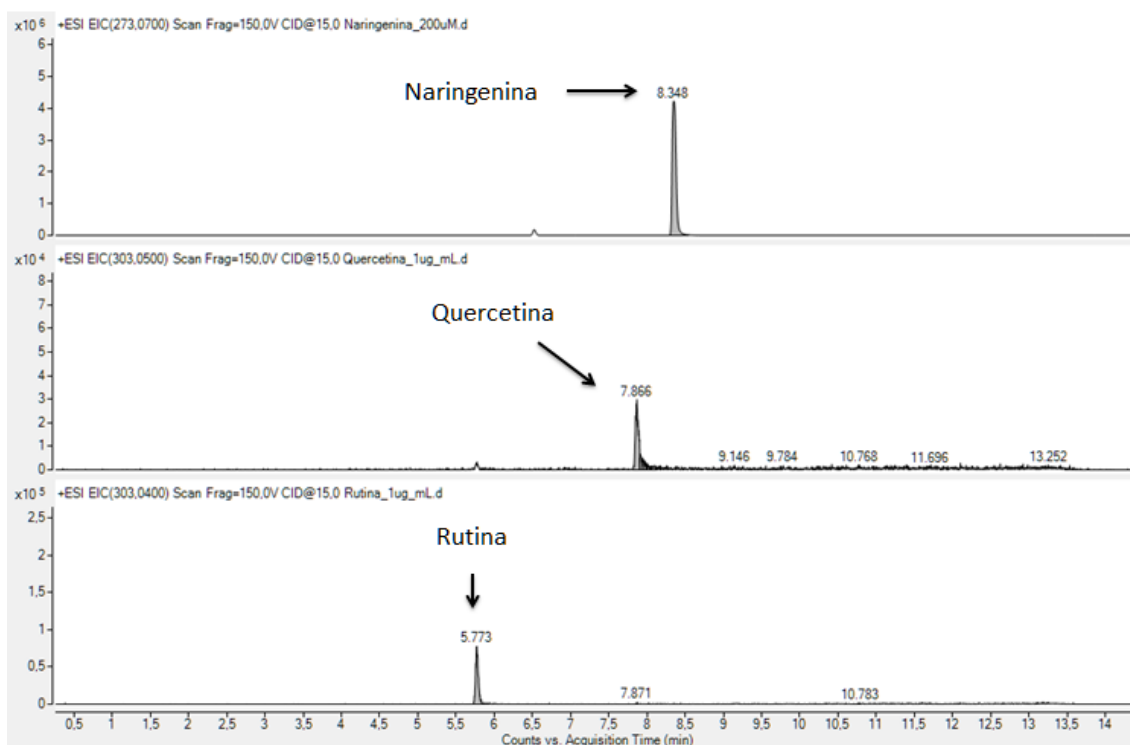


FIGURA A.2: Cromatogramas de EIC para os padrões dos compostos utilizados nos experimentos.



FIGURA A.3: Cromatograma de EIC para os grupos controle dos ensaios enzimáticos.

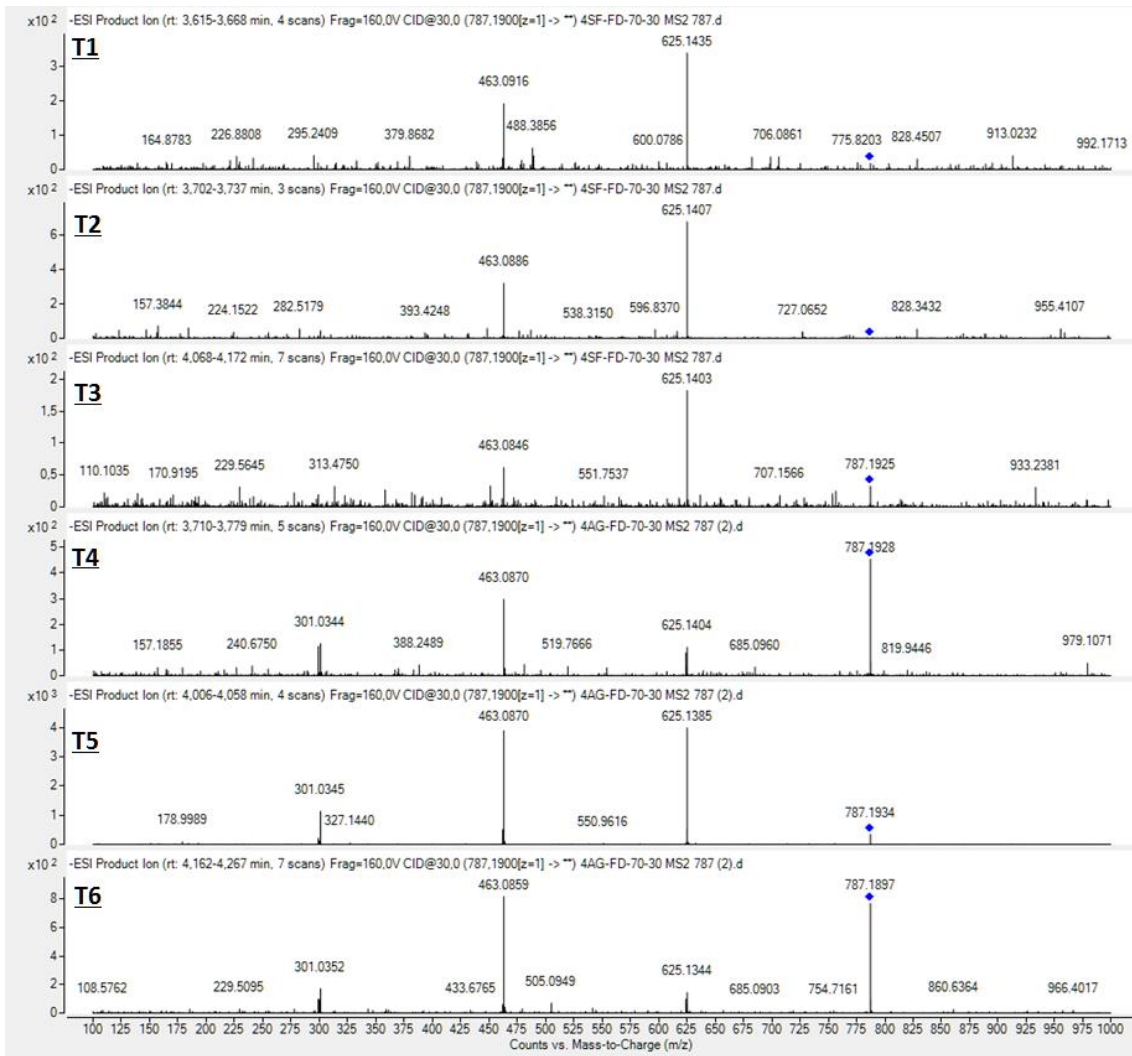


FIGURA A.4: Espectros de MS/MS dos tri-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo quercetina.

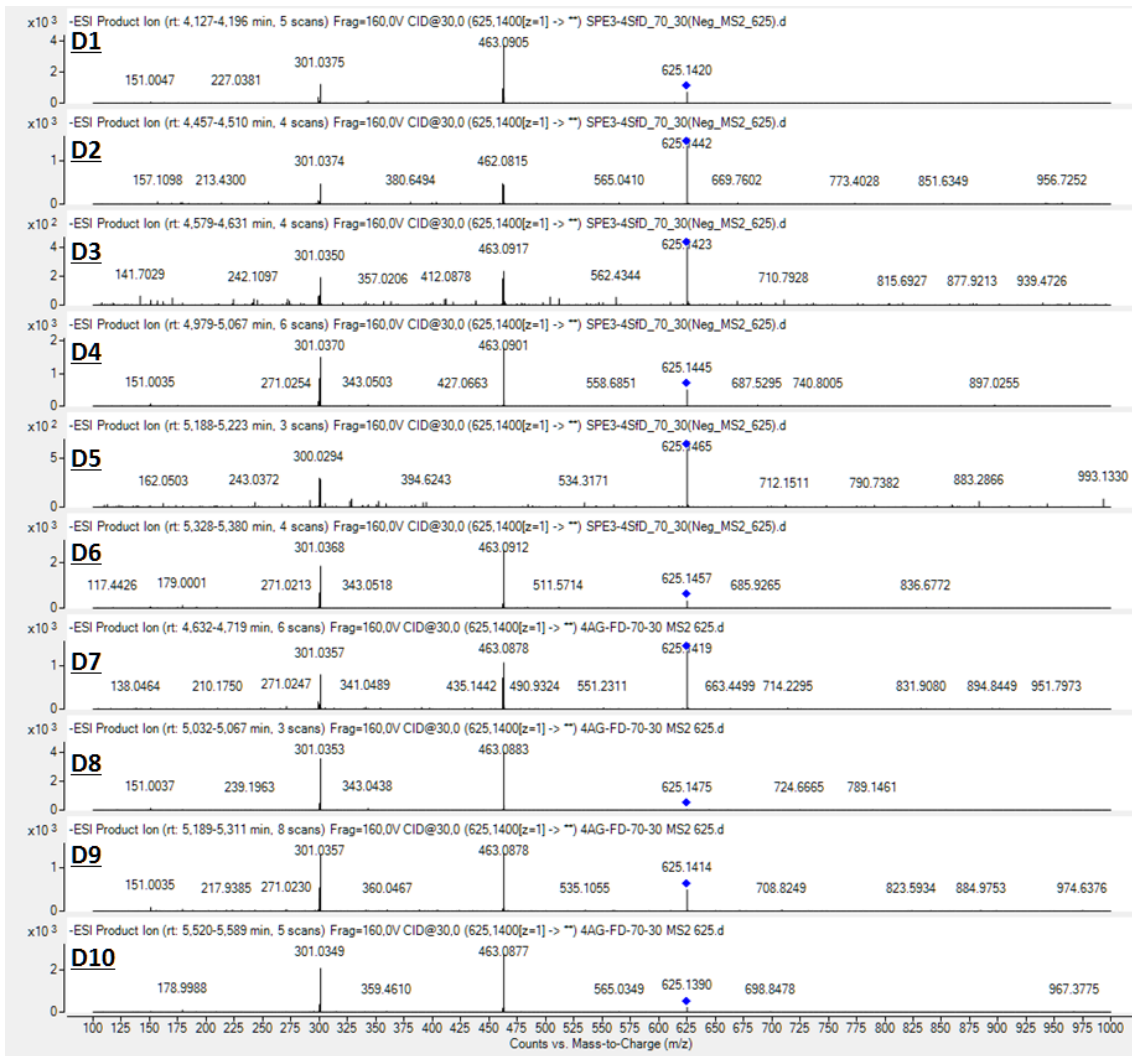


FIGURA A.5: Espectros de MS/MS dos di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

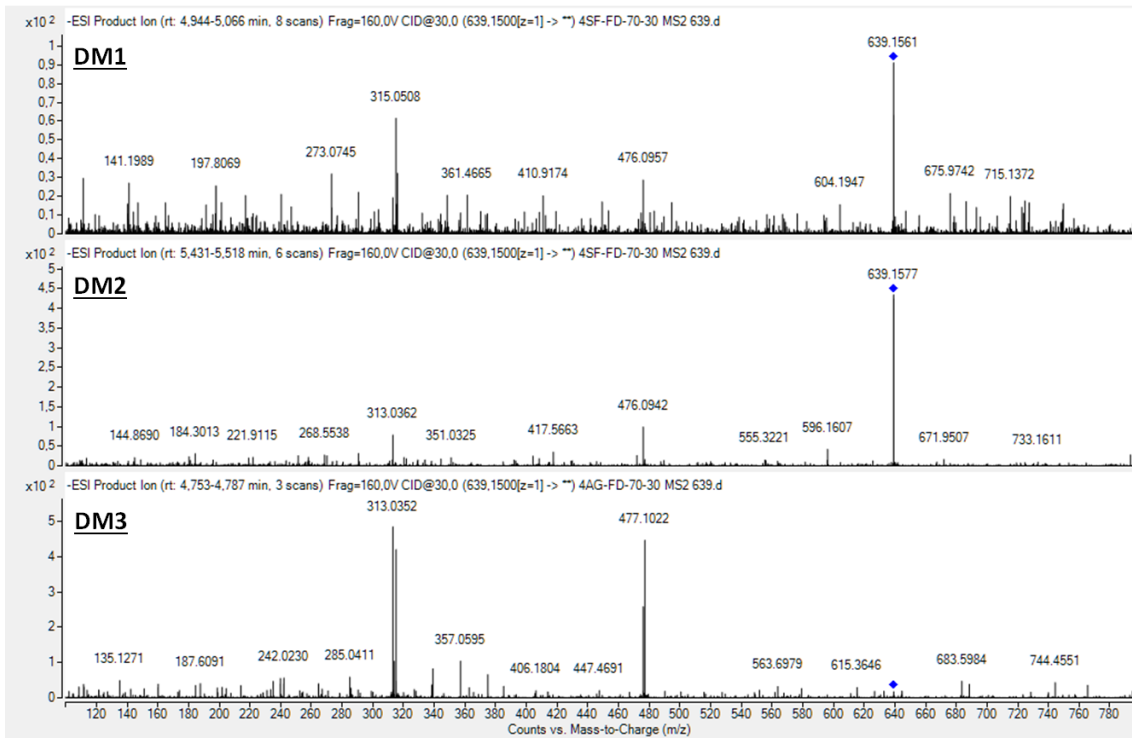


FIGURA A.6: Espectros de MS/MS dos metil-di-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

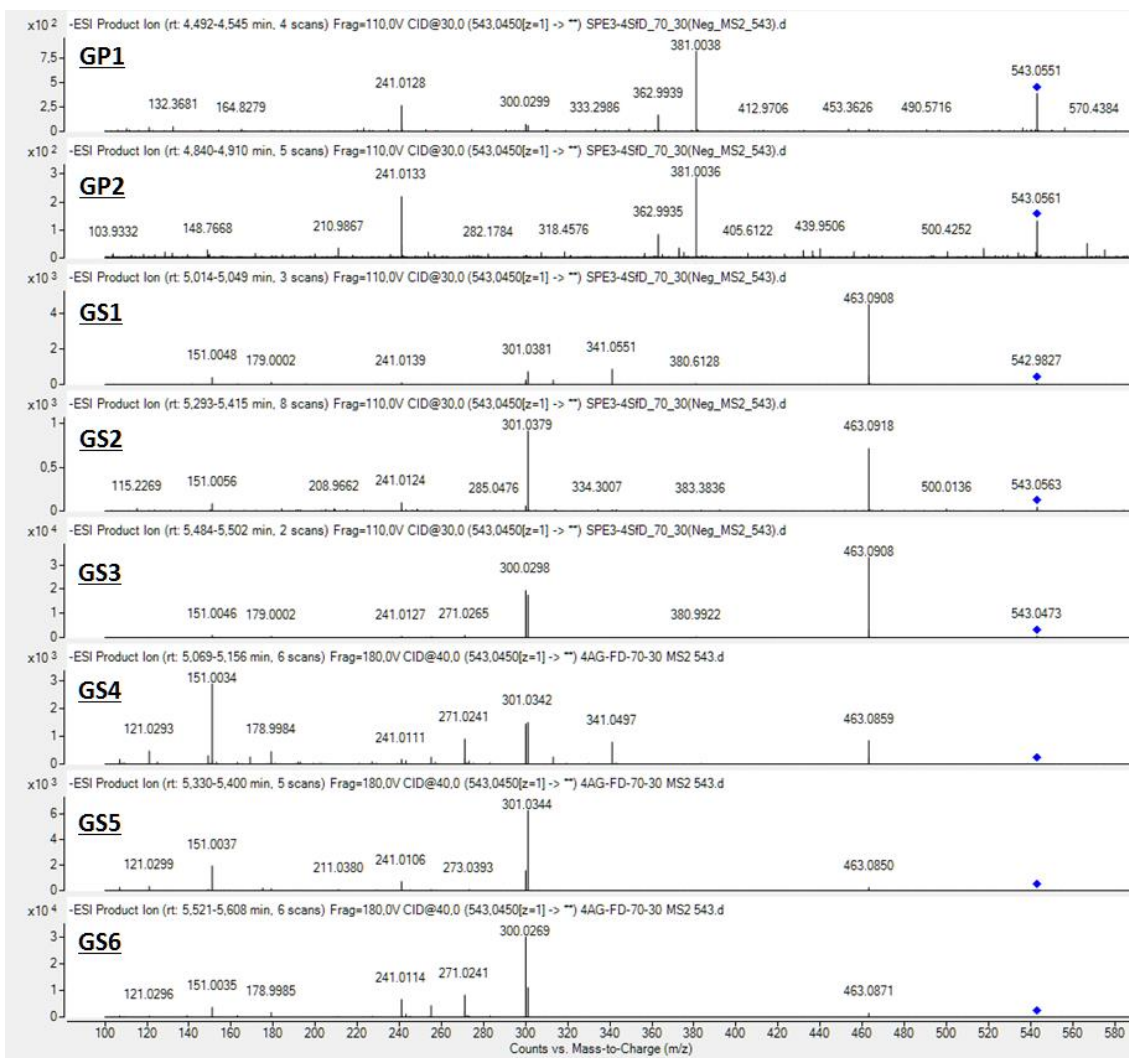


FIGURA A.7: Espectros de MS/MS para os derivados sulfo-glicosilados e fosfo-glicosilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

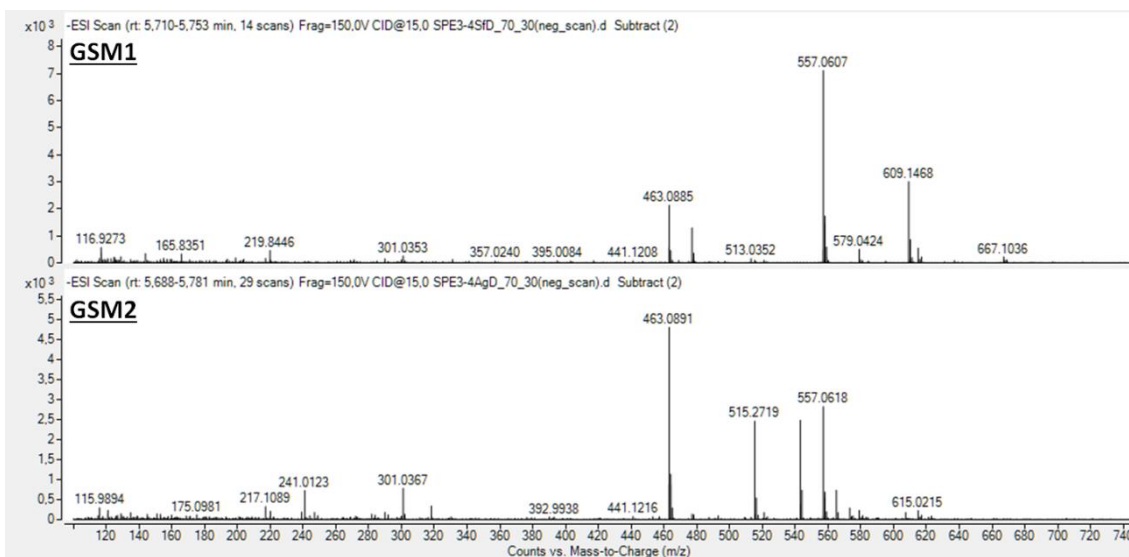


FIGURA A.8. Espectros de HRMS dos derivados metil-sulfo-glicosilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

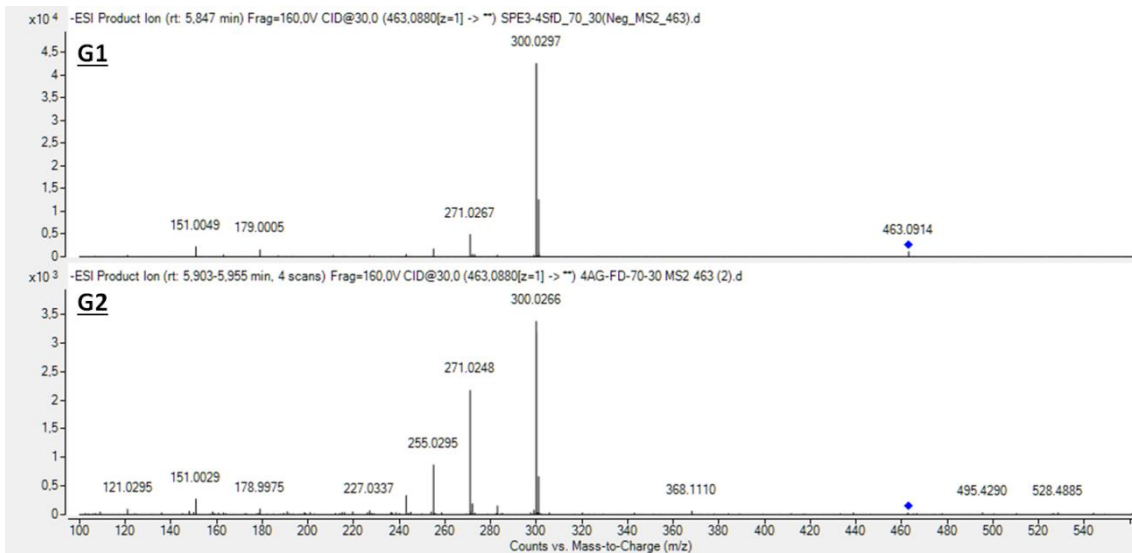


FIGURA A.9. Espectros de MS/MS da isoquercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

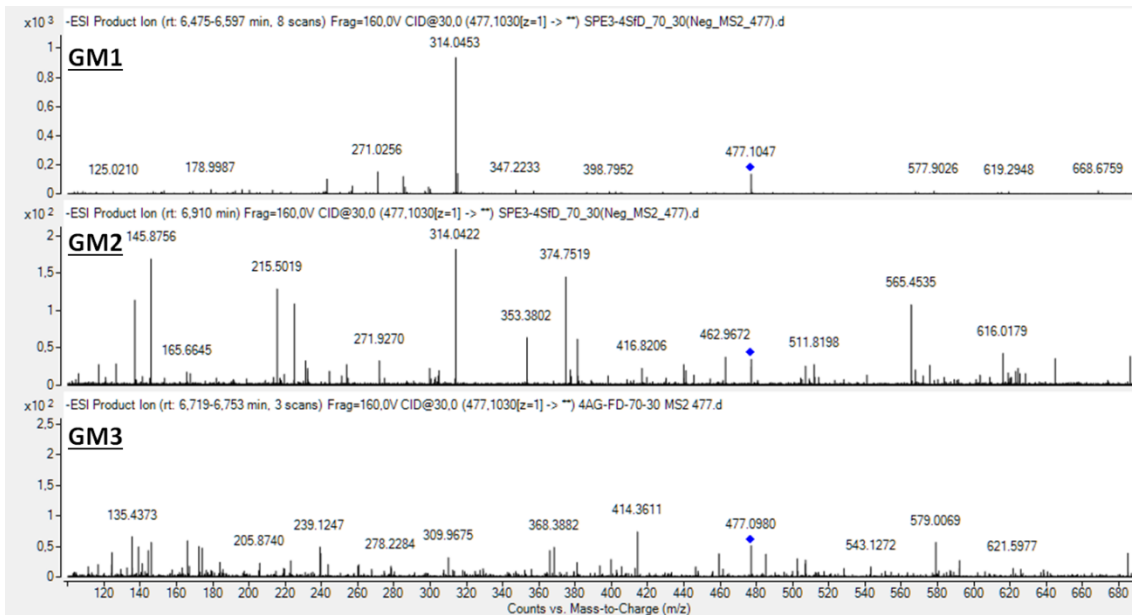


FIGURA A.10: Espectros de MS/MS dos metil-mono-glicosídeos de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo quercetina.

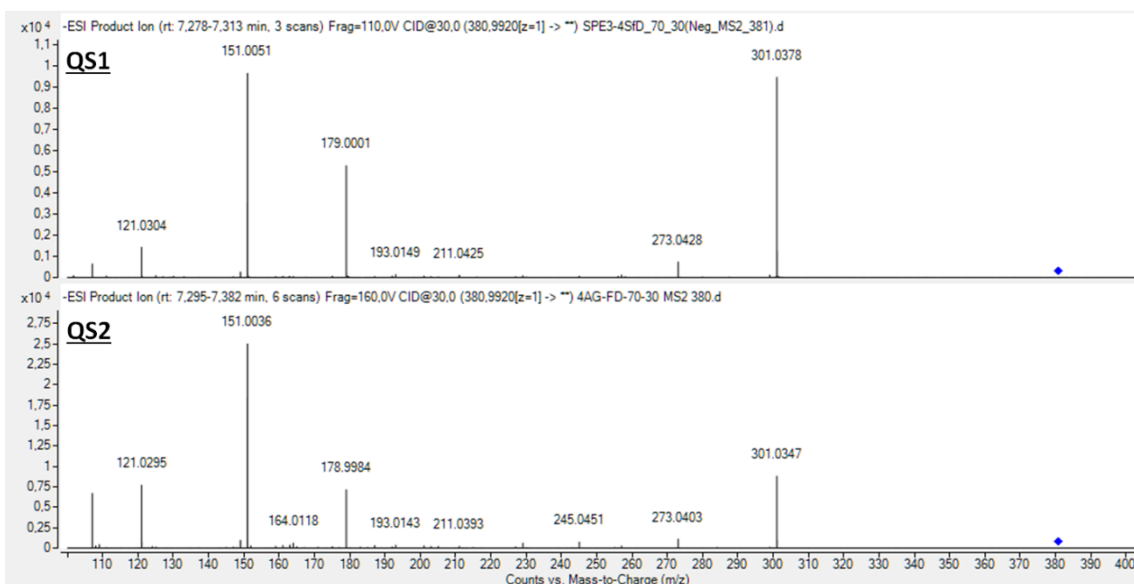


FIGURA A.11: Espectros de MS/MS dos derivados sulfatados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* alimentada com quercetina.

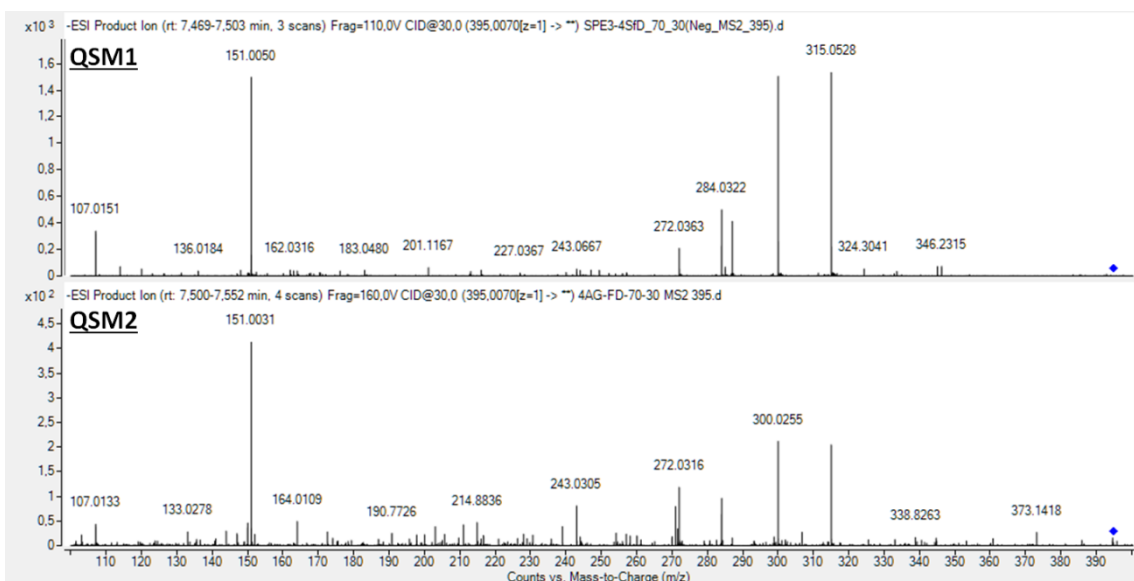


FIGURA A.12: Espectros de MS/MS dos derivados sulfo-metilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* alimentada com dieta contendo quercetina.

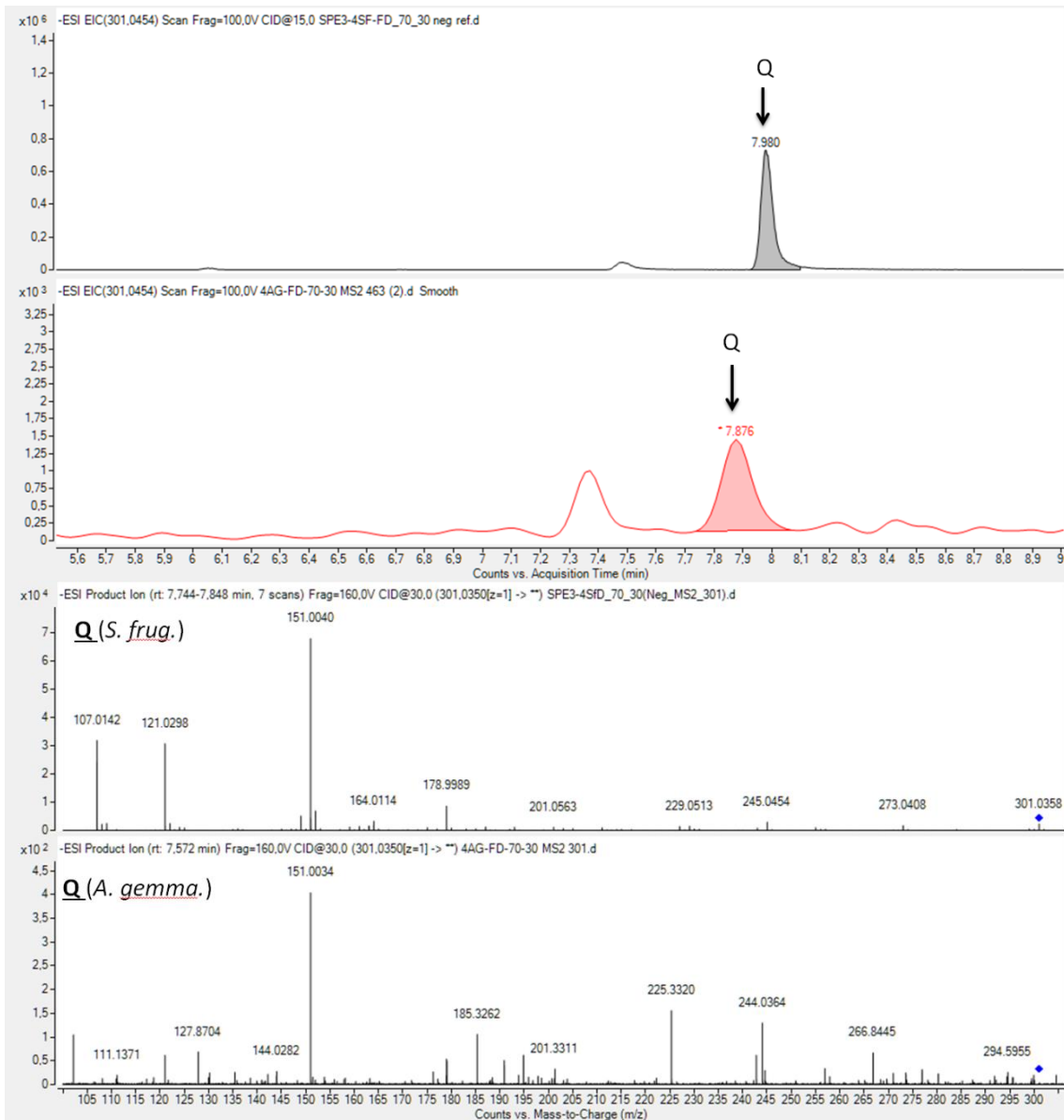


FIGURA A.13: Cromatograma e espectros de MS/MS da quercetina encontrada sem modificações nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentada com dieta contendo quercetina.

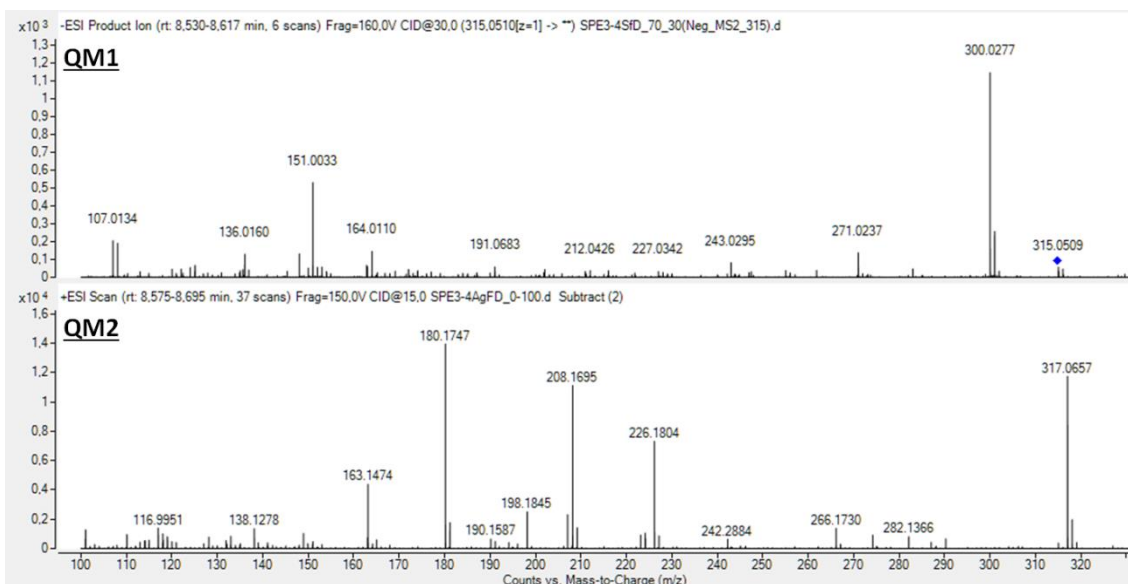


FIGURA A.14: Espectros de MS/MS e HRMS dos derivados metilados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentada com quercetina.

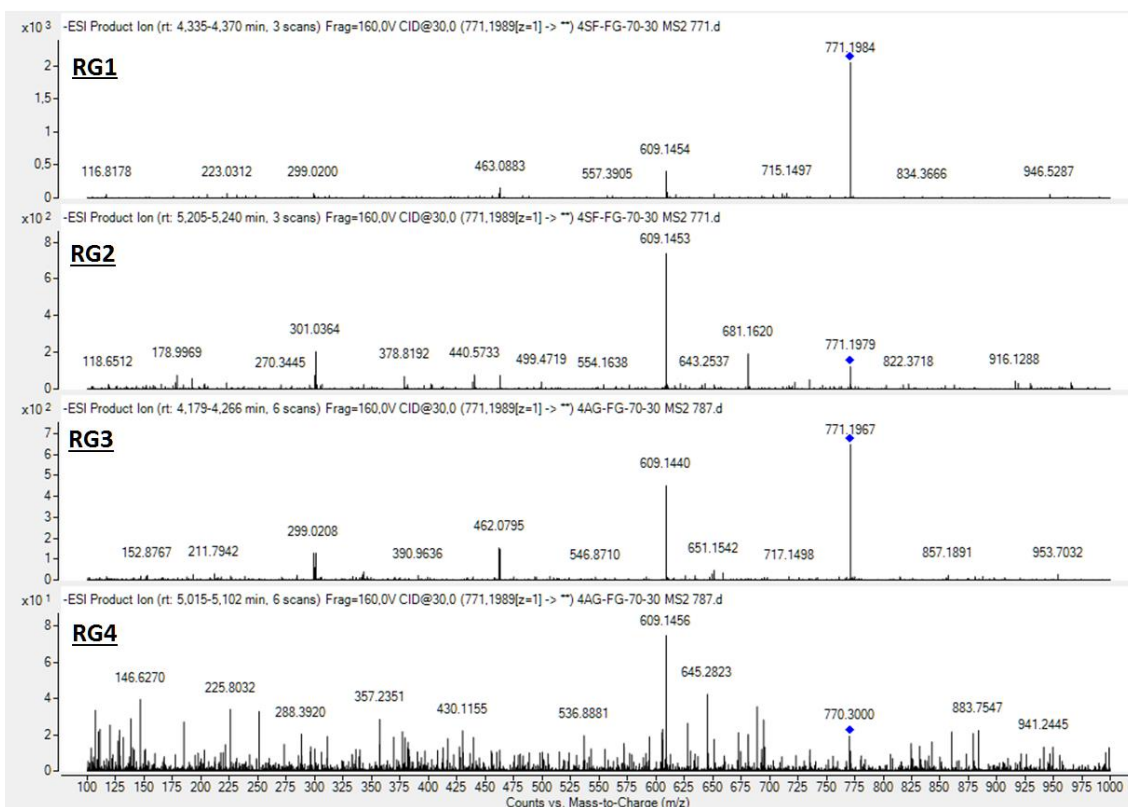


FIGURA A.15: Espectros de MS/MS dos glicosídeos de rutina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo rutina.

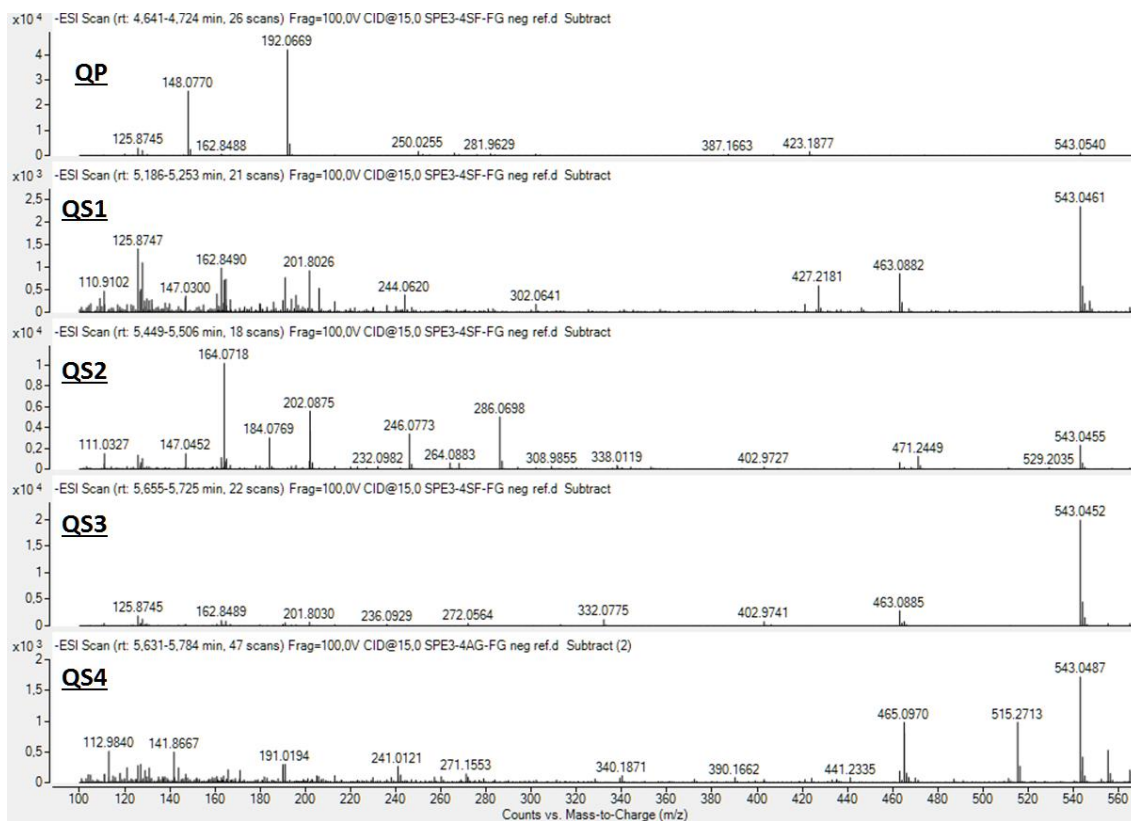


FIGURA A.16: Espectros de MS/MS dos derivados de quercetina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo rutina.

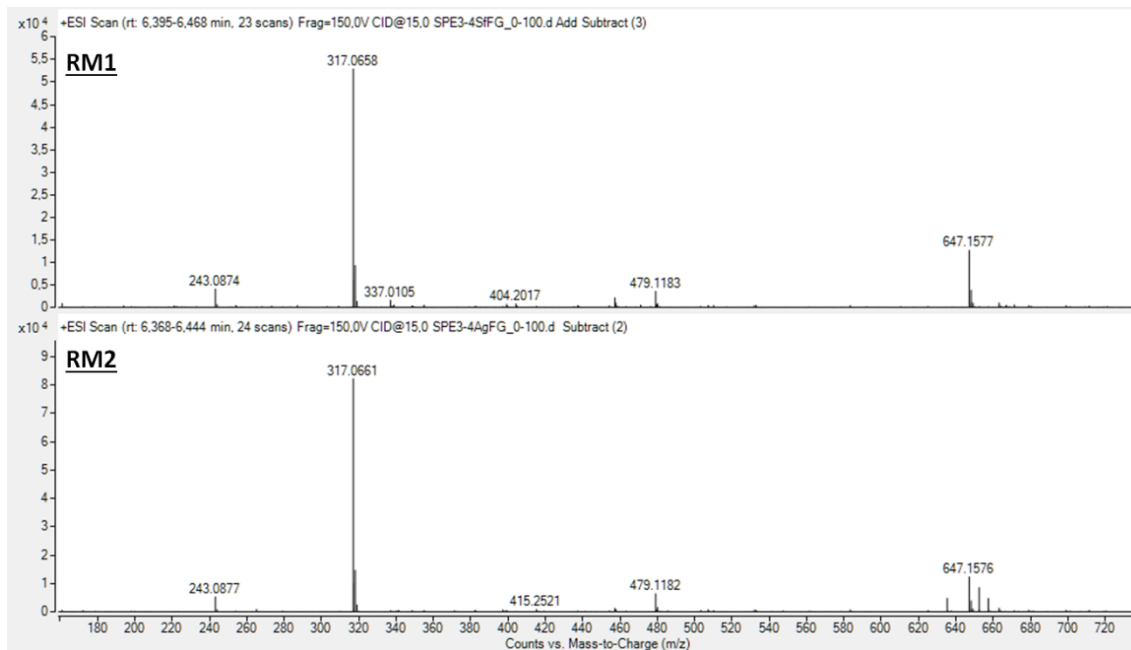


FIGURA A.17: Espectros de HRMS dos derivados metilados de rutina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentada com dieta contendo rutina.

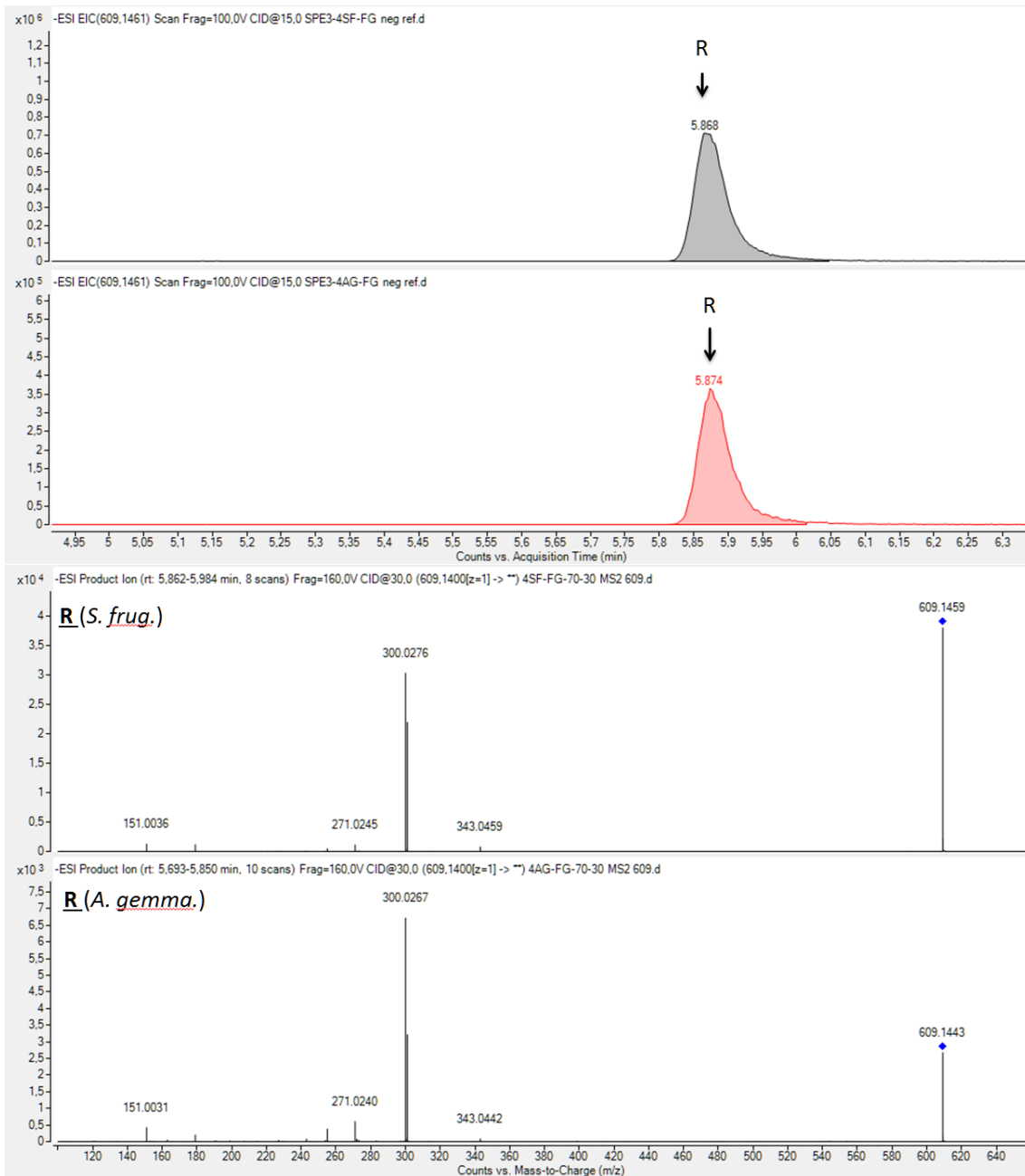


FIGURA A.18: Cromatograma e espectros de MS/MS da rutina encontrada sem modificações nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo rutina.

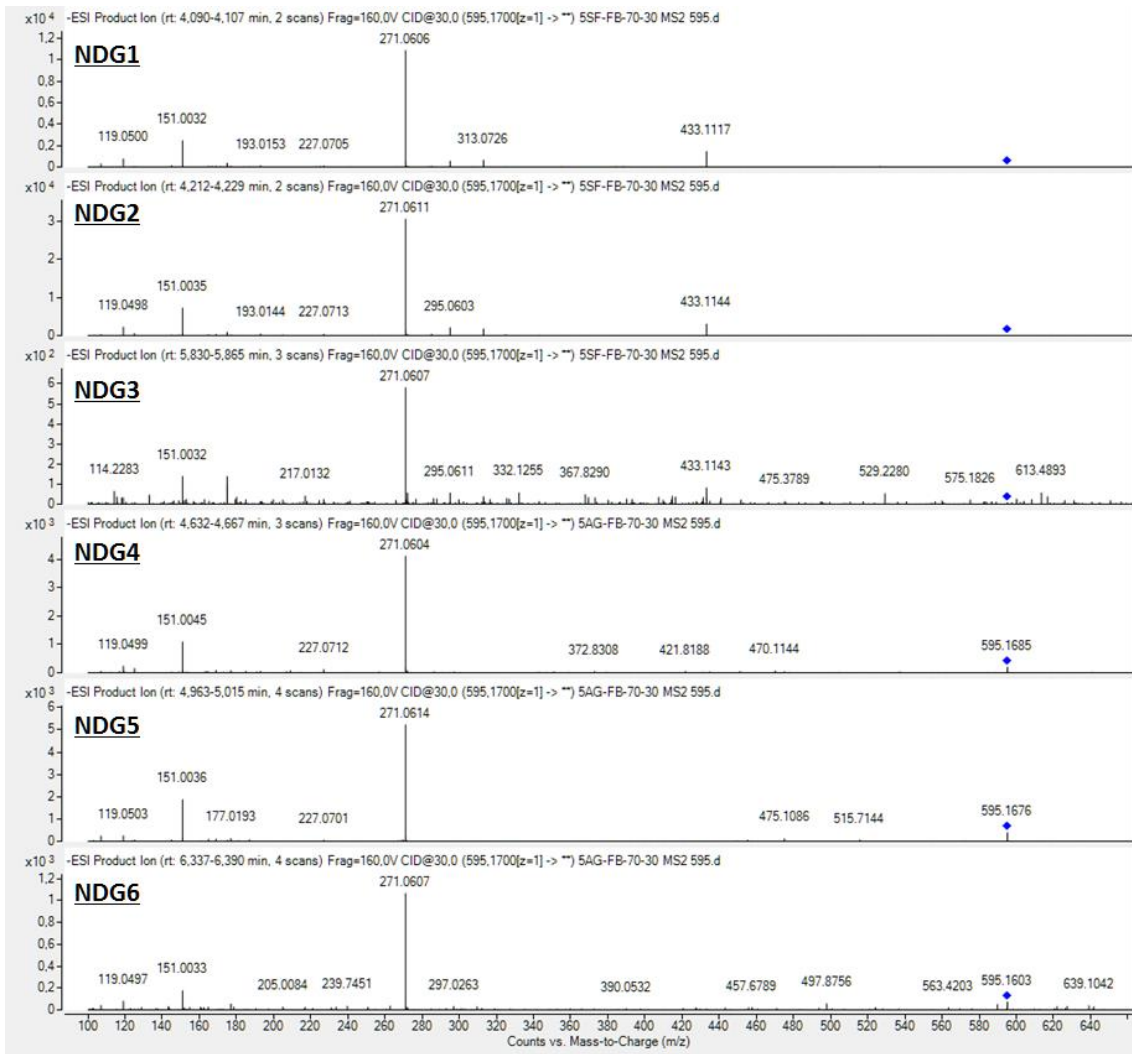


FIGURA A.19: Espectros de MS/MS dos di-glicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A.gemmatalis* alimentadas com dieta contendo naringenina.

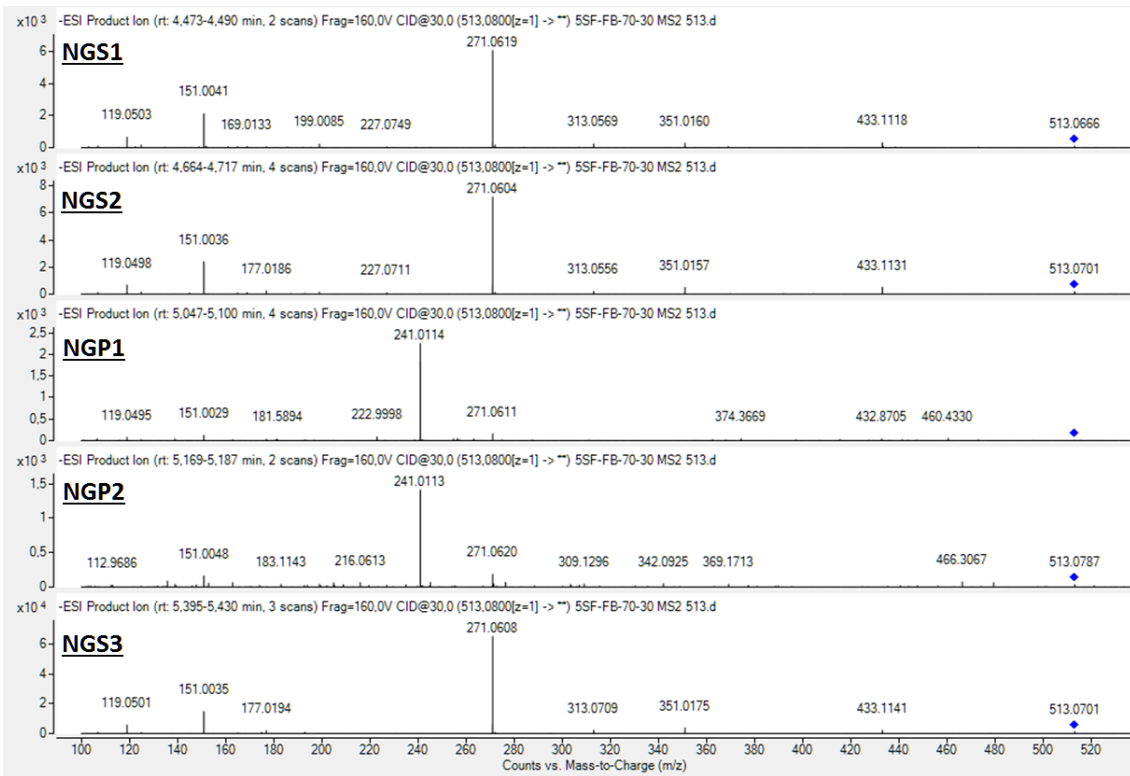


FIGURA A.20: Espectros de MS/MS dos sulfoglicosilados de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* alimentada com dieta contendo naringenina.

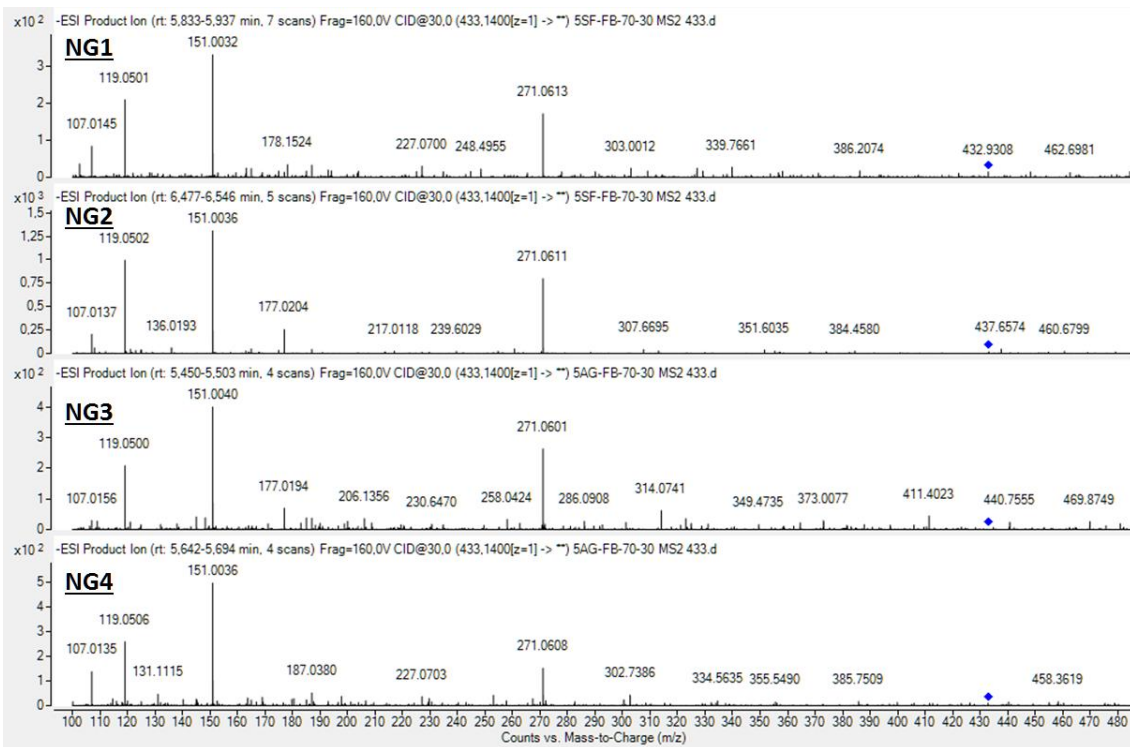


FIGURA A.21: Espectros de MS/MS dos monoglicosídeos de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo naringenina.

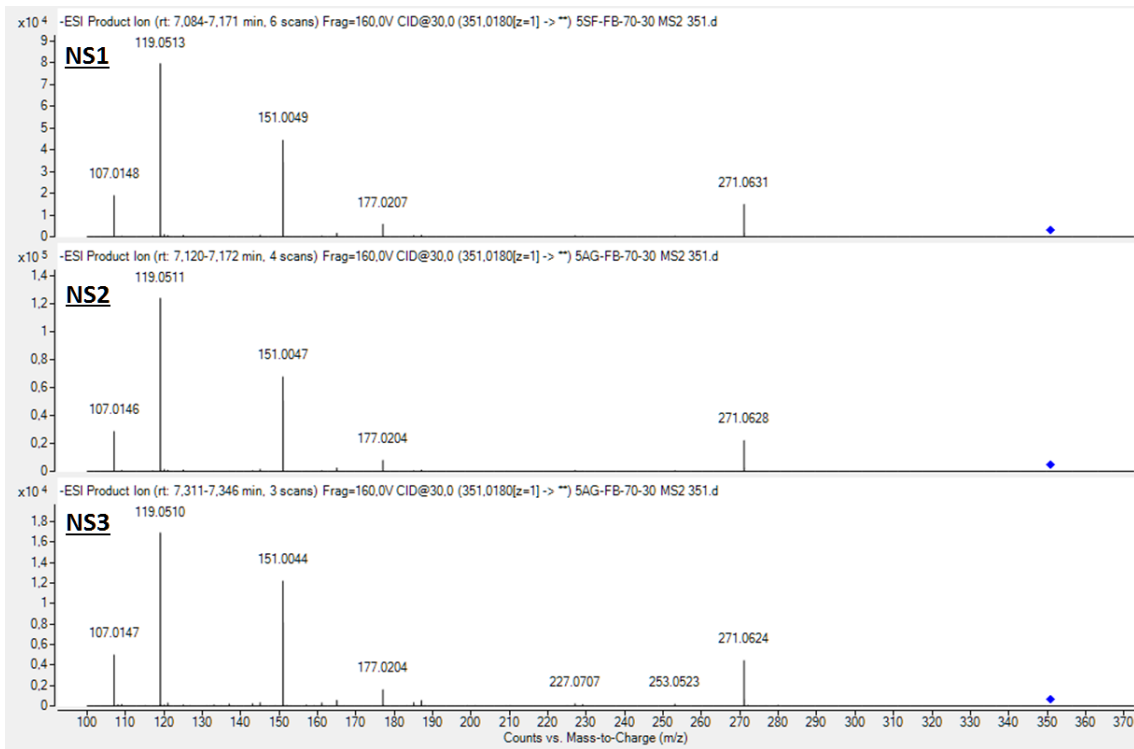


FIGURA A.22: Espectros de MS/MS dos derivados sulfatados de naringenina encontrados nas fezes de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo naringenina.

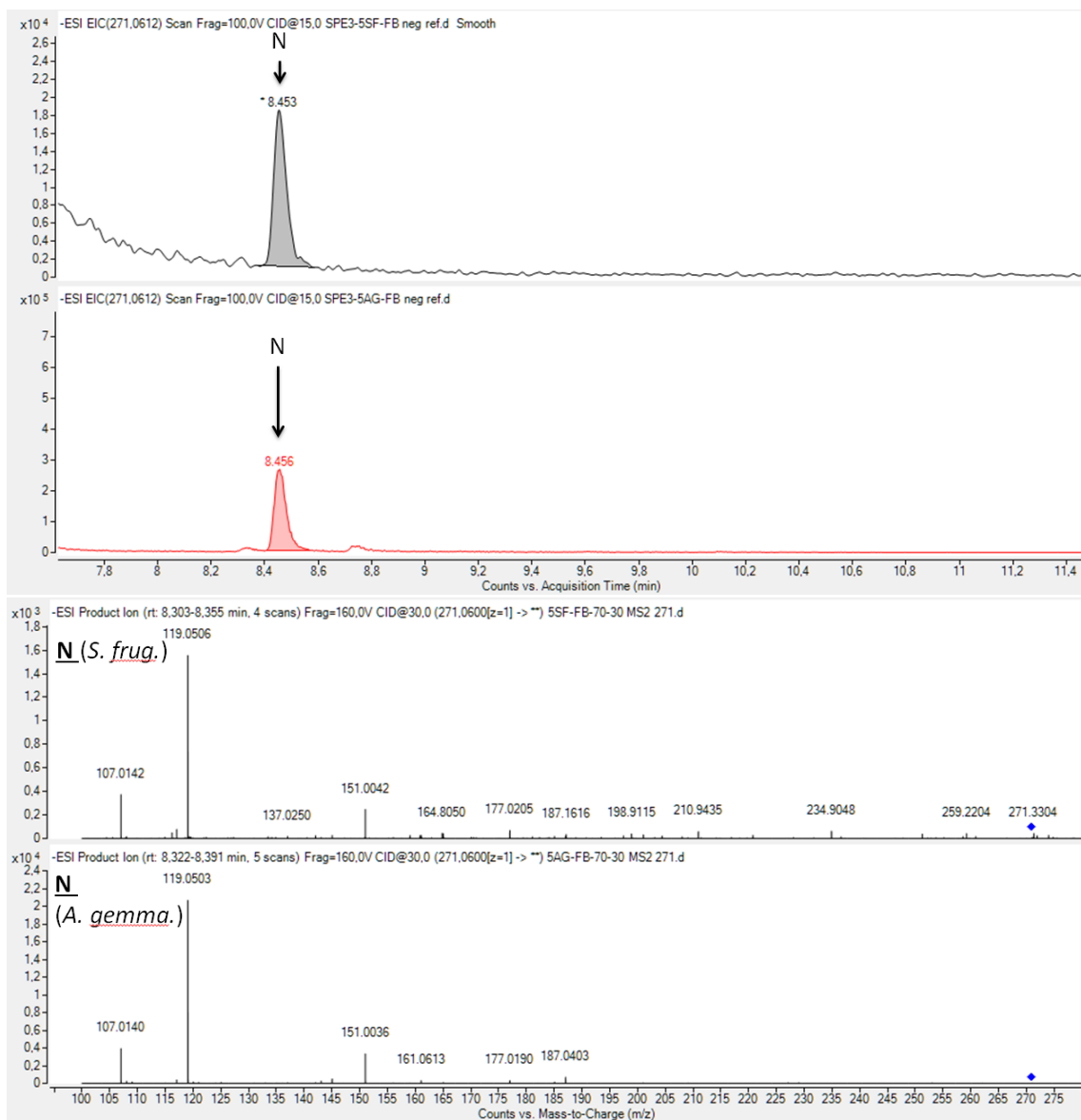


FIGURA A.23: Cromatograma e espectros de MS/MS da naringenina encontrada sem modificações nas fezes de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* alimentada com dieta contendo naringenina.

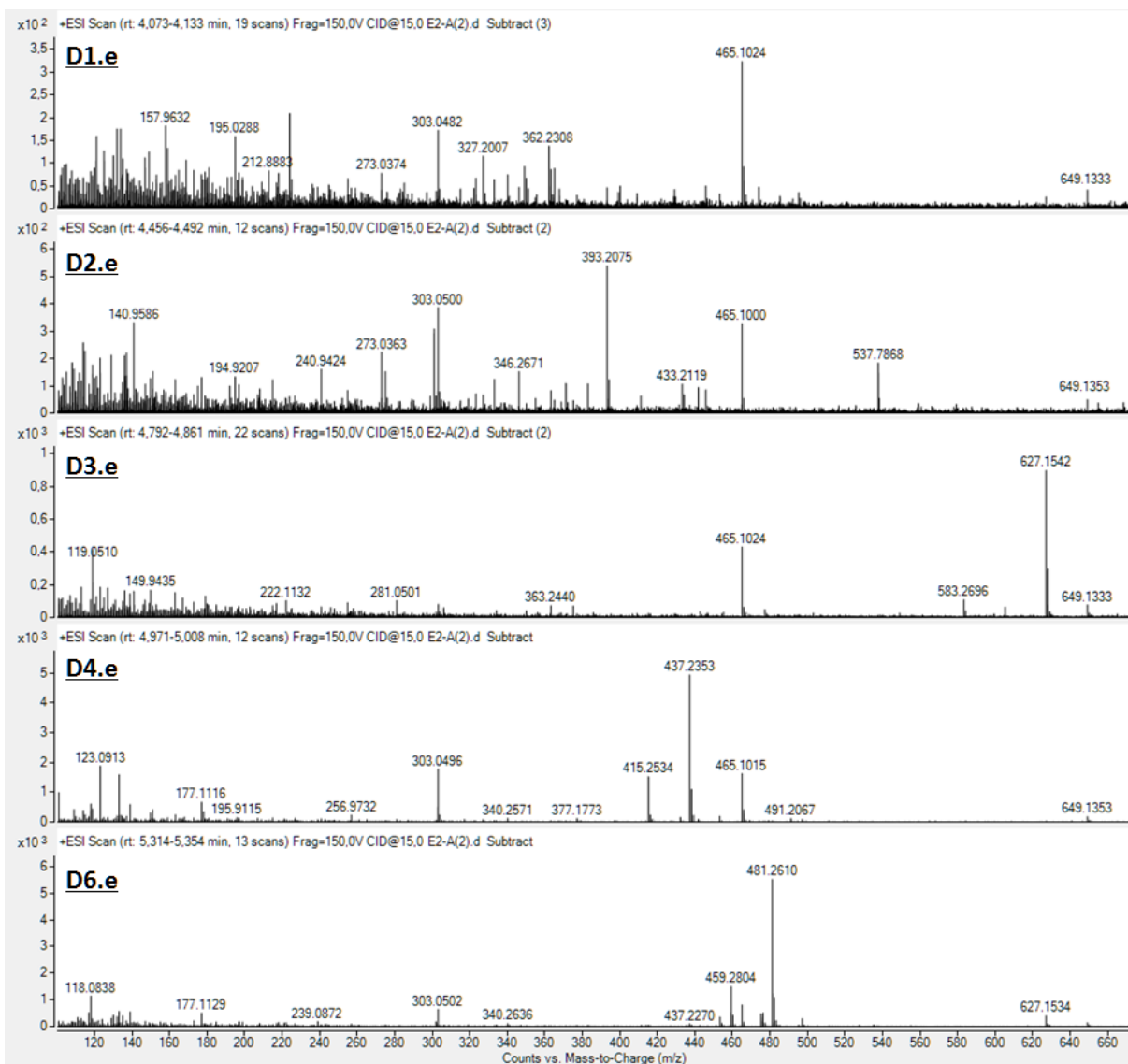


FIGURA A.24: Espectros de HRMS dos di-glicosídeos de quercetina encontrados nos ensaios enzimáticos com *S. frugiperda* utilizando UDP-glicose e quercetina como substratos.

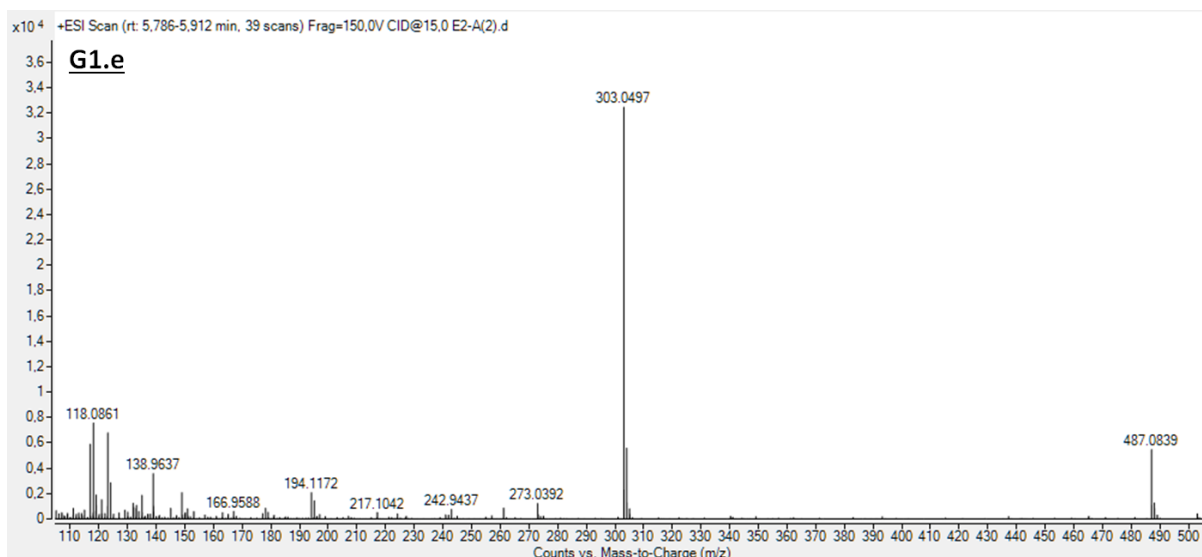


FIGURA A.25: Espectro de HRMS da isoquercetina encontrada nos ensaios enzimáticos com *S. frugiperda* utilizando UDP-glicose e quercetina como substratos.

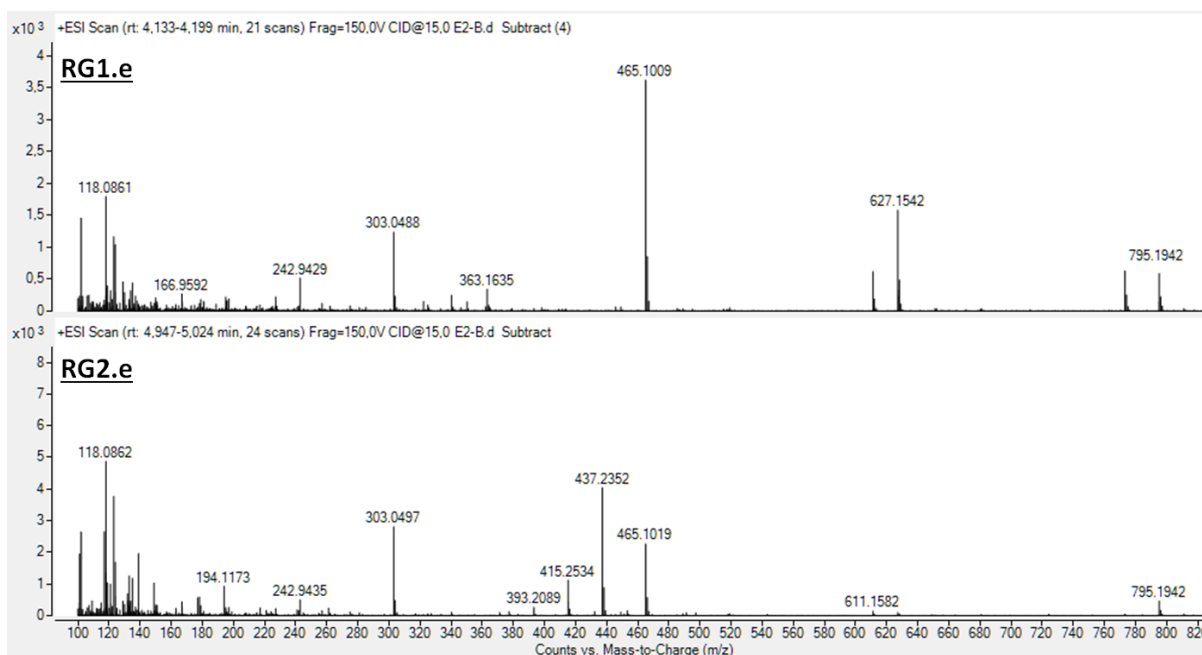


FIGURA A.26: Espectros de HRMS dos glicosídeos de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos com *S. frugiperda* utilizando UDP-glicose e rutina como substratos.

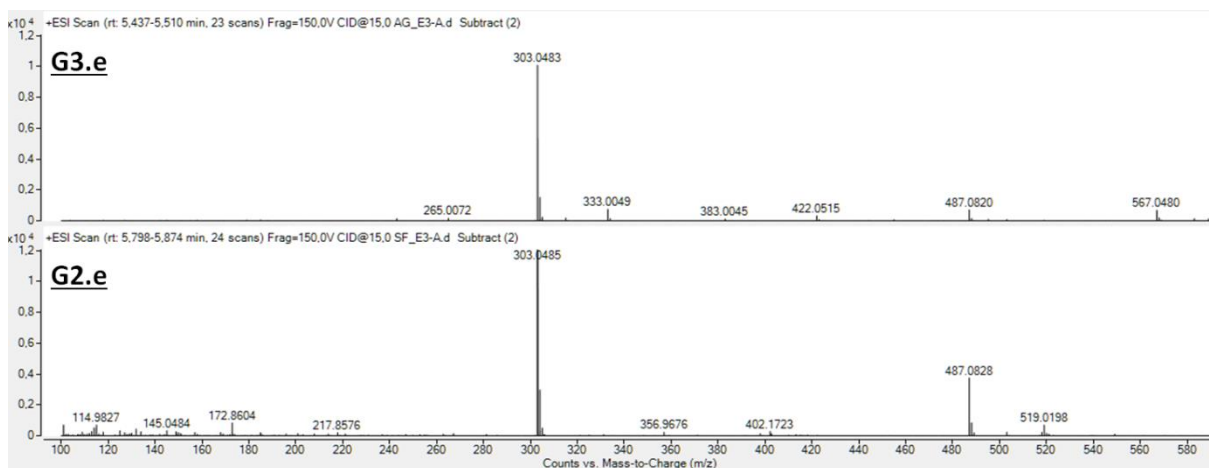


FIGURA A.27: Espectro de HRMS dos glicosídeos de quercetina encontrados nos ensaios enzimáticos com *A. gemmatilis* utilizando UDP-glicose e quercetina como substratos.

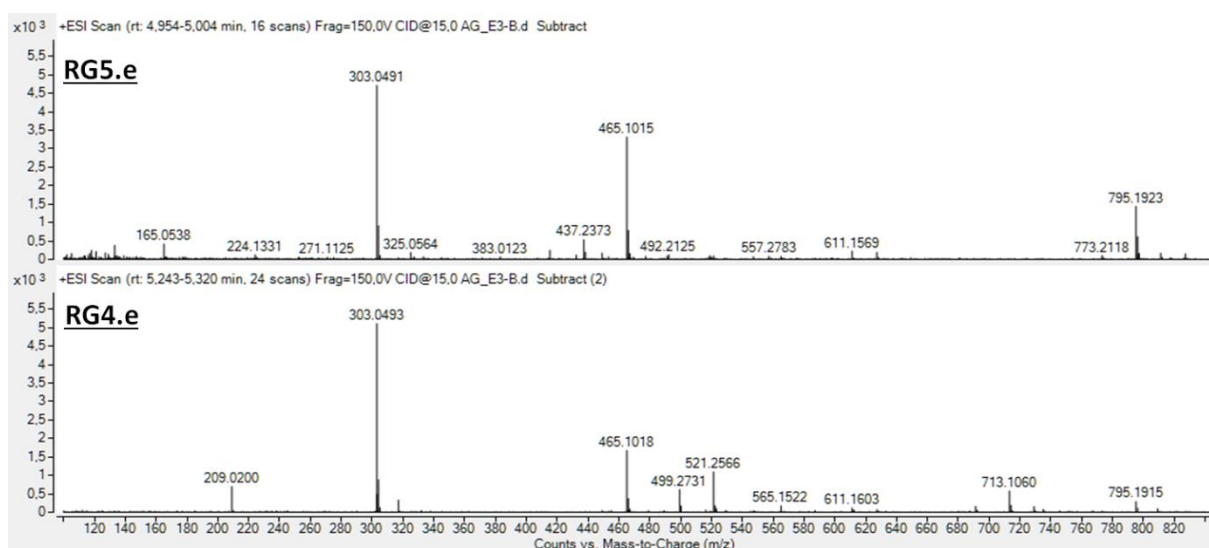


FIGURA A.28: Espectros de HRMS dos glicosídeos de rutina encontrados nos ensaios enzimáticos com *A. gemmatilis* utilizando UDP-glicose e rutina como substratos.