

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

**“BIOTRANSFORMAÇÃO DE FLAVONOIDES EM
LAGARTAS DO GÊNERO *Spodoptera*”**

Renato Cardoso Leal Netto*

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

Orientador(a): Dr. Felipe Christoff Wouters

Coorientador(a): Dr. Moacir Rossi Forim

*** Bolsista CAPES**

São Carlos - SP

2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATO CARDOSO LEL NETTO - Filho de Gicélio Santos Leal e Maristela Castro Nery Maia, natural de Ilhéus, BA, nascido no dia 07 de julho de 1997. Graduado no curso de Química, modalidade em Bacharelado, pela Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, no ano de 2022. Durante a graduação, desenvolveu pesquisas no Laboratório de Controle Biológico e Semioquímicos (LaCoBSe) durante 2.5 anos, na área de Ecologia Química, trabalhando com coleópteras pragas e no Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA) durante 2 anos, realizando pesquisas com pimentas (*Capsicum sp.*) e espécies do gênero Piper com ação antifúngica contra o fungo causador da vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*). Em março de 2022 iniciou o curso de Mestrado em Química - Química Orgânica pela Universidade Federal de São Carlos - PPGQ/UFSCar, Campus de São Carlos, SP, atuando em pesquisas sobre interações planta-inseto e ecologia química, sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

*Dedico este trabalho a Deus, o centro
da minha vida, e a minha família.*

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, que é Deus, por ter me concedido saúde e disposição para o desenvolvimento desta pesquisa. Sem Ele nada seria possível.

À minha mãe, Maristela Maia, pelo apoio e suporte para tomar uma das grandes decisões da minha vida, que foi sair da minha zona de conforto e explorar o mundo além dos limites de casa. Pelo incentivo nos momentos mais difíceis, pelos conselhos e pela compreensão durante toda essa jornada. Ela é a minha inspiração.

À minha vó, Siomara Castro Nery, que também é uma fonte de inspiração para mim, pelo apoio, incentivo, ensinamentos, exemplos de vida e conversas que me fizeram não desistir desse sonho. Além da velha pergunta: “Como vai a escrita da dissertação?”. Afinal, não é nada fácil ser neto de uma professora de escrita científica.

Ao meu tio e padrinho, Gustavo Maia, minha prima e irmã, Maria Luisa (Malú) e a minha tia, Carol Jasmineiro, pelas palavras de incentivo, conversas descontraídas regadas à cerveja, churrasco e aos choros alegres e engraçados. Lembro-me de cada abraço e palavras ditas.

À Júlia, pelo amor, carinho, compreensão e conselhos em todas as horas desse processo. Pelas conversas descontraídas e pela paciência em me apoiar em todas as decisões que precisei fazer (mesmo sabendo que algumas não seriam as melhores escolhas, mas, afinal, é o preço que se paga por ser teimoso).

A todos meus familiares que torcem por mim e pelo entendimento que precisei estar longe em grande parte dessa jornada.

Aos meus amigos da Bahia, de escola até os dias atuais, alguns se foram, outros chegaram, mas sempre deixaram e/ou deixam grandes ensinamentos e lições de vida. Aos meus amigos que a Universidade Estadual de Santa Cruz me proporcionou, em especial Maryellen, a quem torno responsável por representar todos os outros, que sempre me incentivaram a ser uma pessoa e um pesquisador melhor e mais humano (embora, às vezes, eu me perca nesse último ponto).

Aos meus amigos do meu antigo laboratório de pesquisa, na UESC (Laboratório de Controle Biológico e Semioquímicos), e em especial à Prof^a Carla Fávaro, que me incentivaram na vida de pesquisador e iniciaram meus primeiros passos no mundo da

pesquisa. Além disso, agradeço aos ensinamentos diários e boas risadas dentro e fora do laboratório. Precisamos de outras viagens para congressos, como foi a do Chile.

Aos meus amigos que conheci bem antes de ir para São Carlos, Antonio Neto e Yara Pio, pelas boas risadas, palavras de incentivo, apoio e pelas trocas de desespero referentes a disciplina de Química Orgânica Avançada que no final terminava com boas gargalhadas e um “vai dar certo”.

Aos meus amigos que fiz em São Carlos, dentro e especialmente fora de laboratório, Adriel Pugliesi, Alicia Ludymilla, Chrystiane Campos e Gabriel Amaral, pelas trocas de experiências, conversas, risadas regadas a deliciosos vinhos e muita comida típica de cada região, exceto as do Adriel, que não tem comida típica. Não posso deixar de citar a “Jurema” e o paninho do choro, que sempre serviu de apoio e desabafo para todos nós.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Alicia, Anderson, Artur, Carlos, Chrys, Dani, Dorai, Gabriel, Dianne, Eduarda, Evandro, Jesus, Karine, Karen, Leticia, Maria do Carmo, Yara, Antonio e Karol (pertencentes ao Lab. de PN) e Danilo e Lilian (pertencentes ao meu grupo de pesquisa), pelas trocas de conhecimentos, experiência e, muitas vezes, orientações.

Ao Dr. Luciano Pinto, pelos puxões de orelha que me levaram a ter um pouco de conhecimento sobre Espectrometria de Massas. Por todo incentivo e apoio no tratamento de dados e forma de apresentá-los. Agradeço por sempre me dizer sobre minha apresentação e/ou dissertação: “Está excelente. Muito bem” e quase sempre mudar totalmente, para melhor, a maneira de apresentar. Mas o importante é sempre acreditar que estava excelente.

À Dra. Neila Cassiano, que durante um curto espaço de tempo tivemos uma relação meramente profissional, porém, expressando-me de forma sincera, tenho a alegria de dizer que hoje somos amigos. Agradeço a troca de experiência, pelos ensinamentos, pelas conversas, conselhos e por toda atenção que teve por mim durante os momentos que mais precisei. Aproveito para estender meus agradecimentos a Prof^a Quezia Cass que, além de me ensinar como professora e ser um dos meus maiores exemplos e inspirações, me permitiu enxergar o quanto eu sou capaz.

À Prof^a Maria Fátima, pelos ensinamentos de Biossíntese, pelos exemplos de vida, pelas breves conversas, porém, enriquecedoras e pelos incentivos e confiança depositada em mim em várias oportunidades.

Ao meu orientador, Prof. Felipe Wouters, pelas trocas de conhecimento, discussões sobre o trabalho, que sempre me deu oportunidade de pensar e refletir conforme as minhas ideias e executá-las com total liberdade, quando havia sentido.

Aos meus irmãos que a Maçonaria São Carlense me proporcionou, pelo apoio, pelas conversas, pelos ensinamentos e pelas sessões sempre cheias de conteúdo. Agradeço a todos por ter me recepcionado e me introduzido na vida de cada um como família. Não consigo citar o nome de todos, mas sintam-se representados pelos ex-Veneráveis Mestres Ir.: Paulo Pedroso e Ir.: Alex Pádua e atuais Veneráveis Mestres, Ir.: Jayme Oliveira e Ir.: Tadeu Rantin. Caso eu tenha um dia que os resumir em apenas um sentimento, com certeza seria o sentimento de “Família”.

À CAPES pela bolsa de estudos. A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizagem.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em Química (Química Orgânica) em um dos melhores programas do país.

A todos, o meu muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
UDP	<i>Uridine Diphosphate</i>
v/v	volume/volume
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
FBMN	<i>Feature-Based Molecular Networking</i>
EIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.5.1	Gradiente de eluição para análise dos metabólitos excretados nas fezes por UHPLC	25
Tabela 3.5.2	Energias de colisão utilizadas na câmara de dissociação para a formação das fragmentações	26
Tabela 4.2.1	Anotação putativa dos compostos encontrados em fezes de <i>S. frugiperda</i> utilizando a técnica de LC-MS/MS	34
Tabela 4.4.1	Anotação putativa dos compostos encontrados em fezes de <i>S. cosmioides</i> utilizando a técnica de LC-MS/MS	57
Tabela 4.6.1	Anotação putativa dos compostos encontrados em fezes de <i>S. eridania</i> utilizando a técnica de LC-MS/MS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.3.1 Ilustração das fases de detoxificação realizadas por insetos herbívoros	8
Figura 3.2.1 Potes plásticos para armazenamento de ovos e criação de neonatos	10
Figura 3.3.1 Estrutura dos flavonoides utilizados nos bioensaios	11
Figura 3.4.1 Representação esquemática da extração e preparo das amostras	12
Figura 3.6.1 Etapas de processamento dos dados e visualização da rede molecular	15
Figura 4.1 Etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho	
Figura 4.2.1 Dadas brutos adquiridos após a conversão utilizando o msConvert (.mzML)	17
Figura 4.2.2 Filtragem dos interferentes presentes no branco e dos espectros de MS/MS adquiridos após a fase de alinhamento dos dados	18
Figura 4.2.3 Interface do software MS-Finder apresentando informações estruturais, possível fórmula, erro, classe e score	19
Figura 4.2.4 Interface do software MS-Finder apresentando comparativo do espectro experimental com um <i>in silico</i>	19
Figura 4.2.5 Representação de um nodo típico de contaminação dado pela presença em todas as amostras, inclusive no branco	20
Figura 4.2.6 Cluster dos padrões e seus respectivos derivados biotransformados pela espécie <i>S. frugiperda</i> presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras de daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente	23
Figura 4.2.1.1 <i>Cluster</i> dos flavonoides glicosilados (N1) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma	25
Figura 4.2.1.2 <i>Cluster</i> de nodo único (N2) formado pelo íon m/z 417.12, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma	25
Figura 4.2.1.3 <i>Cluster</i> de nodo único (N3) formado pelo íon m/z 435.1271, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e	

amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 26

Figura 4.2.1.4 *Cluster* de nodo único (N4) formado pelo íon m/z 597.1805, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 26

Figura 4.2.2.1 *Cluster* de nodo único (N5) formado pelo íon m/z 545.0592, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 27

Figura 4.2.3.1 *Cluster* N1 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 335.0220 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 28

Figura 4.2.3.2 *Cluster* de nodo único (N6) formado pelo íon m/z 351.0171, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 29

Figura 4.2.3.3 *Cluster* de nodo único (N7) formado pelo íon m/z 353.0325, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 29

Figura 4.2.4.1 *Cluster* N1 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 283.0964 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 30

- Figura 4.2.4.2 *Cluster* de nodo único (N8) formado pelo íon m/z 317.0670, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 31
- Figura 4.3.1.1.1 Cromatograma de EIC para os mono-glicosídeos de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina 33
- Figura 4.3.1.2.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfatado de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina 34
- Figura 4.3.1.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado alquilado de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina 35
- Figura 4.3.1.3.2 Proposta de fragmentação radicalar para o derivado alquilado de daidzeina 48
- Figura 4.3.1.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado glicosilado de genisteina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de genisteina 36
- Figura 4.3.1.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfatado de genisteina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de genisteina 36
- Figura 4.3.3.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado mono-glicosilado de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina 38
- Figura 4.3.3.2.1 Cromatograma de EIC para o derivado di-glicosilado de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina 39
- Figura 4.3.3.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfatado de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina 40
- Figura 4.3.4.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado mono-glicosilado de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina 41
- Figura 4.3.4.2.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfo-glicosilado de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina 42
- Figura 4.3.4.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado metilado de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina 42

- Figura 4.4.1 *Cluster* dos padrões e seus respectivos derivados biotransformados pela espécie *S. cosmioides* presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras de daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente 45
- Figura 4.4.1.1 *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N9) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 46
- Figura 4.4.1.2 *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N10) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 47
- Figura 4.4.2.1 *Cluster* N9 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 335.0242 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 48
- Figura 4.4.2.2 *Cluster* N9 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 351.0180 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 49
- Figura 4.4.2.3 *Cluster* N10 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 353.0340 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 50
- Figura 4.4.3.1 *Cluster* de nodo único (N11) formado pelo íon m/z 317.0663, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi

encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 51

Figura 4.4.4.1 *Cluster* de nodo único (N12) formado pelo íon m/z 287.0560, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma 52

Figura 4.3.4.3.1 Cromatograma de EIC para os derivados mono-glicosilados de naringenina em extrato de fezes de *S. cosmioides* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina 53

Figura 4.5.2.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado mono-glicosilado de quercetina em extrato de fezes de *S. cosmioides* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina 53

Figura 4.5.2.1.2 Proposta de fragmentação de um derivado C-glicosilado com a abertura parcial do anel do açúcar 54

Figura 4.6.1 *Cluster* dos padrões e seus respectivos derivados biotransformados pela espécie *S. eridania* presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras de daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente 57

RESUMO

GLICOSILAÇÃO DE ISOFLAVONAS E FLAVONOIDES EM LAGARTAS DO GÊNERO *Spodoptera*. As lagartas do gênero *Spodoptera* são insetos herbívoros polívoros, ou seja, se alimentam de uma grande variedade de culturas, sendo essas de grande interesse econômico no Brasil, incluindo milho, algodão, sorgo e a soja. Embora essas culturas sejam bem protegidas pelos seus principais compostos defensivos, como os flavonoides, as larvas de espécies deste gênero ainda são capazes de se desenvolver nas plantações, sugerindo uma alta capacidade de detoxificação contra esses compostos, apesar de pouco se saber sobre os produtos desse metabolismo. Os dados disponíveis sobre a adaptação de insetos fitófagos frente às defesas químicas de plantas sugerem que, embora a estrutura química de alguns inseticidas sintéticos seja semelhante a esses xenobióticos, as características de defesa são diferentes entre essas duas classes de seleção. Desta forma, esse trabalho teve como justificativa a identificação e comparação dos produtos do metabolismo de flavonoides por esses insetos e dos genes e enzimas envolvidas nessas biotransformações que podem fornecer informações sobre a sua alta capacidade de adaptação a novas plantas hospedeiras, podendo revelar novas estratégias para seu controle no campo. Este estudo teve como objetivo principal investigar a capacidade de detoxificação de flavonoides e isoflavonas em espécies do gênero *Spodoptera*. Foi realizada a análise qualitativa de extrato de fezes desses insetos por LC-MS/MS, após administração oral dos compostos de interesse e a comparação dos dados obtidos de cada uma das espécies. A rede molecular resultante das análises de espectrometria de massas (MS/MS) no modo positivo consistiu em 3457 íons precursores para o extrato de *S. frugiperda*, 1644 para extrato de *S. cosmioides* e 728 para extrato de *S. eridania*, os quais foram apresentados como nodos (interligados ou único). Além disso, a plataforma GNPS conseguiu anotar um total de 36, 42 e 29 substâncias para *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*, respectivamente, proporcionando uma abrangente visualização dos compostos presentes nos extratos dos respectivos tratamentos. Vale ressaltar que, dentre esses compostos anotados pelo GNPS, apenas 7 substâncias foram consideradas como de interesse para a discussão dos resultados de *S. frugiperda*, 9 substâncias para *S. cosmioides* e 8 para *S. eridania*. Além disso, mais 9 substâncias, que não foram anotadas, foram consideradas como sendo derivados de compostos com núcleo flavânico. Além de derivados mono-glicosilados em extrato de fezes das 3 espécies de lagartas testadas com as 4 agliconas, foram identificados outros compostos presentes em extrato de fezes de larvas de *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania* alimentadas apenas com dieta enriquecida com os padrões das agliconas, incluindo diferentes regioisômeros. Foi observado que *S. eridania* foi capaz de glicosilar apenas padrão de daidzeína, enquanto, *S. frugiperda* e *S. cosmioides* apresentaram derivados glicosilados de todos os padrões administrados, gerando compostos possivelmente menos tóxicos. Nossos resultados fornecem informação de dados qualitativos acerca de possíveis reações bioquímicas empregadas por 3 espécies do gênero *Spodoptera* no metabolismo de compostos com esqueleto flavânico e contribuem de forma significativa para futuras pesquisas sobre suas interações “inseto-planta” quimicamente defendidas.

ABSTRACT

GLYCOSYLATION OF ISOFLAVONES AND FLAVONOIDS IN CATERPILLARS OF THE GENUS *Spodoptera*. Caterpillars of the genus *Spodoptera* are polyphagous herbivorous insects, meaning they feed on a wide variety of crops, which are of great economic interest in Brazil, including corn, cotton, sorghum, and soybeans. Although these crops are well protected by their main defensive compounds, such as flavonoids, larvae of species in this genus are still able to develop in plantations, suggesting a high detoxification capacity against these compounds, despite little being known about the products of this metabolism. Available data on the adaptation of phytophagous insects to plant chemical defenses suggest that, although the chemical structure of some synthetic insecticides is similar to these xenobiotics, defense characteristics differ between these two selection classes. Thus, this work aimed to identify and compare the products of flavonoid metabolism by these insects and the genes and enzymes involved in these biotransformations, which may provide information about their high capacity to adapt to new host plants, potentially revealing new strategies for their control in the field. This study aimed to investigate the detoxification capacity of flavonoids and isoflavones in species of the genus *Spodoptera*. Qualitative analysis of fecal extracts from these insects was performed by LC-MS/MS after oral administration of the compounds of interest, and the data obtained from each species were compared. The resulting molecular network from mass spectrometry (MS/MS) analyses in positive mode consisted of 3457 precursor ions for *S. frugiperda* extract, 1644 for *S. cosmioides* extract, and 728 for *S. eridania* extract, which were presented as nodes (interconnected or unique). Additionally, the GNPS platform was able to annotate a total of 36, 42, and 29 substances for *S. frugiperda*, *S. cosmioides*, and *S. eridania*, respectively, providing a comprehensive visualization of the compounds present in the extracts of the respective treatments. It is worth noting that among these compounds annotated by GNPS, only 7 substances were considered of interest for the discussion of *S. frugiperda* results, 9 substances for *S. cosmioides*, and 8 for *S. eridania*. Furthermore, an additional 9 substances, which were not annotated, were considered derivatives of compounds with a flavanic nucleus. In addition to mono-glycosylated derivatives in fecal extracts from the 3 tested caterpillar species with the 4 aglycones, other compounds were identified in fecal extracts of *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides*, and *S. eridania* larvae fed only with diet enriched with aglycone standards, including different regioisomers. It was observed that *S. eridania* was able to glycosylate only the daidzein standard, while *S. frugiperda* and *S. cosmioides* presented glycosylated derivatives of all administered standards, generating possibly less toxic compounds. Our results provide qualitative information about possible biochemical reactions employed by 3 species of the genus *Spodoptera* in the metabolism of compounds with a flavanic skeleton and significantly contribute to future research on their chemically defended "insect-plant" interactions.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	2
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo Geral.....	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Diferentes estratégias de defesa de plantas.....	5
2.1.1 Defesas constitutivas e induzidas	6
2.2 Defesas químicas de soja: Flavonóides e Isoflavonas	6
2.3 Resistência dos insetos: Mecanismo de detoxificação	7
2.4 Gênero <i>Spodoptera</i> (Lepdopetar: Noctuidae).....	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Aquisição de ovos.....	10
3.2 Dieta mínima artificial.....	10
3.3 Ensaio biológicos	11
3.4 Extração e preparo de amostra.....	12
3.5 Análises cromatográficas e espectrométricas	12
3.6 Processamento dos dados obtidos por LC-MS/MS	14
3.7 Obtenção do cDNA dos insetos.....	16
3.7.1 Coleta e preparo de amostra dos tecidos larvais	16
3.7.2 Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.2 Anotação dos metabólitos encontrados em fezes de <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
4.2.1 Anotação dos metabólitos <i>O</i> -glicosilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. frugiperda</i>	23
4.2.2 Anotação dos metabólitos sulfo-glicosilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. frugiperda</i>	26
4.2.3 Anotação dos metabólitos sulfatados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. frugiperda</i>	27

4.2.4 Anotação dos metabólitos alquilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. frugiperda</i>	29
4.3 Estudo dos padrões de fragmentação observados em derivados dos padrões de flavonoides administrados em dieta artificial.....	31
4.3.1 Derivados de daidzeína em extrato de fezes de <i>Spodoptera frugiperda</i>	31
4.3.1.1 Derivados glicosilados de daidzeína.....	32
4.3.1.2 Derivados sulfatados de daidzeína.....	33
4.3.1.3 Derivados alquilados de daidzeína.....	34
4.3.2 Derivados de genisteína em extrato de fezes de <i>S. frugiperda</i>	35
4.3.2.1 Derivado glicosilado de genisteína	36
4.3.2.2 Derivado sulfatado de genisteína	36
4.3.3 Derivados de naringenina em extrato de fezes de <i>S. frugiperda</i>	37
4.3.3.1 Derivado mono-glicosilado de naringenina	38
4.3.3.2 Derivado di-glicosilado de naringenina	38
4.3.3.3 Derivado sulfatado de naringenina	39
4.3.4 Derivados de quercetina em extrato de fezes de <i>S. frugiperda</i>	39
4.3.4.1 Derivado glicosilado de quercetina.....	40
4.3.4.2 Derivado sulfo-glicosilado de quercetina	41
4.3.4.3 Derivado alquilado de quercetina	41
4.4 Anotação dos metabólitos encontrados em fezes de <i>Spodoptera cosmioides</i>	42
4.4.1 Anotação dos metabólitos glicosilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. cosmioides</i>	45
4.4.2 Anotação dos metabólitos sulfatados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. cosmioides</i>	47
4.4.3 Anotação dos metabólitos alquilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. cosmioides</i>	50
4.4.4 Anotação dos metabólitos reduzidos encontrados em fezes dos insetos de <i>S. cosmioides</i>	51
4.5 Estudo dos padrões de fragmentação observados em derivados dos padrões de flavonoides administrados em dieta artificial.....	52
4.5.1 Derivados de naringenina em extrato de fezes de <i>Spodoptera cosmioides</i>	52
4.5.1.1 Derivados mono-glicosilados de naringenina.....	52
4.5.2 Derivados de quercetina em extrato de fezes de <i>S. cosmioides</i>	53
4.5.2.1 Derivado mono-glicosilado de quercetina	53
4.5.2.2 Derivado reduzido de quercetina	54
4.6 Anotação dos metabólitos encontrados em fezes de <i>Spodoptera eridania</i>	55
4.6.1 Anotação dos metabólitos glicosilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. eridania</i>	57

4.6.2 Anotação dos compostos sulfatados encontrados em fezes de insetos de <i>S. eridania</i> .	58
4.6.3 Anotação dos metabólitos alquilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. eridania</i>	60
4.6.4 Anotação dos metabólitos reduzidos encontrados em fezes dos insetos de <i>S. eridania</i>	61
4.6.5 Anotação dos metabólitos sulfo-alquilados encontrados em fezes dos insetos de <i>S. eridania</i>	62
4.7 Estudo dos padrões de fragmentação observados em derivados dos padrões de flavonoides administrados em dieta artificial.....	63
4.7.1 Derivados de daidzeina em extrato de fezes de <i>S. eridania</i>	63
4.7.1.1 Derivado sulfo-alquilado de daidzeina	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	72

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, as plantas expressaram e otimizaram um número considerável de mecanismos de defesa em combate a diferentes condições ambientais, como o ataque de macro e microrganismos opositores. A produção de metabólitos secundários e proteínas de defesa são exemplos desses mecanismos contra herbívoros artrópodes, que podem ocasionar tanto a morte de organismos não adaptados como acarretar a dificuldade de digestão e redução na absorção de nutrientes, resultando no não desenvolvimento desses herbívoros (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

Esses mecanismos de defesa das plantas podem ser apresentados de forma constitutiva, quando já estão presentes nos tecidos vegetais em concentrações consideravelmente fixas, sem depender da presença de agentes externos e, de forma indutiva, quando carecem de meios específicos para ativar a sua produção, como por exemplo a herbivoria. Embora as defesas constitutivas estejam presentes constantemente nos tecidos das plantas, a indução defensiva tem como vantagem reduzir o emprego de modos de defesa e desestimular a adaptação e a evolução da resistência dos herbívoros (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

Sendo assim, os mecanismos de resistência devem ser o produto sinérgico da múltipla ação de proteínas de defesa e dos compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas (SOUZA, 2014). Em geral, espécies de leguminosas, como a soja (*Glycine max* L.), em seu mecanismo de defesa, carecem de metabólitos secundários tóxicos pujantes, que são presentes em espécies de plantas de famílias como a Brassicaceae e Solanaceae (KOGAN, 1986; PIUBELLI et al., 2005). Entretanto, foram identificados alguns compostos fenólicos em diversos órgãos da soja que desempenham funções importantes na resistência contra microrganismos e insetos opositores (PIUBELLI et al., 2005), como os flavonoides constitutivos (HOFFMANN-CAMPO, 1995) e/ou induzidos (FISHER; KOGAN, 1991).

Em contrapartida, entender a diversidade de respostas de insetos frente a esses xenobióticos representa um desafio fundamental, visto que pouco se sabe sobre o destino metabólico desses compostos no organismo dos insetos. Os dados disponíveis sobre a adaptação de insetos fitófagos frente a defesas químicas de plantas sugerem que, embora a estrutura química de alguns inseticidas sintéticos seja semelhante a esses xenobióticos, as características de defesa são diferentes entre essas duas classes (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007). A bioconversão desses xenobióticos é uma das principais características que os insetos desenvolveram em sua coevolução (BERENBAUM, 2002; DESPRÉS; DAVID;

GALLET, 2007). A defesa metabólica dos insetos, em sua maioria, é resultante da alta produção de enzimas de detoxificação que são responsáveis por metabolizar esses compostos químicos de defesas de plantas (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007)

Além de defesas de plantas, em seu nicho ecológico, os insetos também estão sujeitos a pressões seletivas de predadores, parasitóides e competidores, resultando na variação do grau e natureza de sua defesa frente aos produtos químicos das plantas hospedeiras, obedecendo a posição geográfica dos fenótipos de plantas e da particularidade da combinação planta-inseto (DESPRÉS; DAVID; GALLET, 2007).

1.1 Justificativa

As plantas apresentam uma alta variedade de compostos secundários defensivos, entre os quais estão os flavonoides e isoflavonas, e a proporção estudada ainda é baixa quando se trata de mecanismos de detoxificação de insetos frente a tais compostos. Mais experimentos são necessários para aumentar o conhecimento sobre como os insetos não só percebem esses flavonoides em suas fases adulta e larval, mas também de como o arsenal enzimático de detoxificação desses insetos atua na sua adaptação a plantas hospedeiras. Isso nos ajudaria a compreender melhor o papel que os flavonoides desempenham nas interações planta-inseto e nas evoluções de especificidade de hospedeiros.

Estudos anteriores realizados no nosso grupo de pesquisa indicam que *Spodoptera frugiperda* é capaz de metabolizar quercetina por glicosilação, formando isoquercetina (3-*O*-glicosídeo de quercetina), além de formar também uma grande variedade de metabólitos di- e tri-glicosilados, metilados, sulfonados e fosforilados, os quais são excretados nas fezes. Essa espécie também é capaz de glicosilar a isoflavona genisteína, formando um *O*-monoglicosídeo diferente da genistina (7-*O*-glicosídeo de genisteína) originalmente presente na planta, embora não tenha sido observada a extensa glicosilação *in vivo* das isoflavonas daidzeína e gliciteína. Essas reações de glicosilação foram replicadas em ensaios enzimáticos *in vitro* usando tecido intestinal homogeneizado de *S. frugiperda* e UDP-glicose como coenzima, confirmando assim o envolvimento de UDP-glicosiltransferases (UGTs). A biotransformação de metabólitos secundários de plantas por UGTs também é observada e sugerida como rota de detoxificação em outros insetos, como a capsaicina em lagartas do gênero *Helicoverpa* (AHN et al. 2011), gossipol em *Helicoverpa armigera* e *Heliothis virescens* (KREMPL et al. 2016), e benzoxazinoides em *S. frugiperda* e *S. littoralis* (WOUTERS et al. 2016; ISRANI et al. 2018). No momento, outro projeto do grupo está concentrado na expressão heteróloga de UGTs de *S. frugiperda* e ensaios para determinar

quais membros específicos dessa família de enzimas estão envolvidos na glicosilação de flavonoides por esse inseto. Até o momento foram encontrados 43 genes que codificam UGTs no genoma de *S. frugiperda*, o que está dentro do número esperado para insetos da ordem Lepidoptera (AHN et al. 2012).

Para se testar a hipótese de que o arsenal enzimático de detoxificação de insetos herbívoros está associado com a gama de plantas hospedeiras que podem ser utilizadas e com o sucesso em novos eventos de colonização, é primeiro necessário fazer um levantamento dos genes que codificam as enzimas responsáveis por tais reações metabólicas. Além de *Spodoptera frugiperda*, outras espécies desse gênero como *S. cosmioides* e *S. eridania* também são altamente polífagas e representam importantes pragas agrícolas. Conjuntamente, essas três espécies formam o “complexo *Spodoptera*”, que causa danos significativos em várias culturas brasileiras, em especial na soja e no milho. Mesmo dentro da espécie *S. frugiperda*, observa-se a presença de dois biótipos: milho e arroz; que apresentam diferentes preferências alimentares. Apesar de menos comum no Brasil, *S. albula* tem sido identificada com mais frequência no campo e pode vir a fazer parte do complexo *Spodoptera* nos próximos anos. A identificação e comparação dos produtos do metabolismo de flavonoides por esses insetos e dos genes e enzimas envolvidos nessas biotransformações pode fornecer pistas sobre a sua alta capacidade de adaptação a novas plantas hospedeiras, podendo revelar novas estratégias para seu controle no campo, como por exemplo, o silenciamento de genes que codificam enzimas responsáveis pelos mecanismos de detoxificação.

Dessa forma, esse projeto visou explorar os produtos do metabolismo de daidzeína, genisteína, quercetina e naringenina frente a três espécies de lagartas do gênero *Spodoptera* (*S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*), através da adição desses compostos em dietas artificiais.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a capacidade de detoxificação de flavonoides e isoflavonas em espécies do gênero *Spodoptera* (*S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar qualitativamente fezes das lagartas do gênero *Spodoptera* por LC-MS/MS após administração oral de daidzeína, genisteína, quercetina e naringenina para identificar os metabólitos excretados;

- Analisar os dados processados pelos softwares *MS Dial* e *MS Finder* e as anotações no GNPS;
- Investigar os padrões de fragmentação de massas dos compostos biotransformados pelos insetos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diferentes estratégias de defesa de plantas

Entender os diferentes mecanismos de defesa de plantas relacionados com a sua evolução e identificar as pressões seletivas associadas têm sido um desafio nas últimas décadas. Tornou-se cada vez mais perceptível que a diversidade de interações dentro de populações de plantas é um importante fator para evolução de suas estratégias de defesa (KANT et al., 2015). Sendo assim, surgiram várias teorias que rodeiam o dilema central de que as defesas de plantas necessitam de recursos que estariam relacionados ao crescimento e à reprodução (STAMP, 2003; KANT et al., 2015). Essas teorias são classificadas em dois grupos: explicação sobre a distribuição das defesas de plantas relacionada a função defensiva e na história de evolução de plantas e, outro, relacionada a disponibilidade de recursos.

A primeira explicação, a teoria da defesa ótima, leva em consideração que plantas com poucos recursos defenderão seus diferentes tecidos vegetais de forma distinta, dependendo das chances de ataque, da função do tecido e do custo de defesa (ZANGERL; RUTLEDGE, 1996; KANT et al., 2015). A segunda é a hipótese da aparência das plantas, apresentada por Feeny (1976), que propõe que as plantas atacadas por uma variedade grande de herbívoros necessitam expressar uma maior diversidade de defesas do que aquelas que sofrem ataques por poucas espécies. A terceira hipótese é a do balanço “carbono:nutriente”, que relaciona a defesa química de plantas com a variação de nutrientes no meio e dita que a relação “carbono:nutriente” controla quais metabólitos secundários são sintetizados (BRYANT et al., 1983; KANT et al., 2015). A quarta e quinta hipóteses estão relacionadas, respectivamente, com a disponibilidade de recursos, postulando que as estratégias de defesa estão relacionadas com o crescimento vegetal, supondo ser limitada pela disponibilidade de recursos (COLEY et al., 1985) e, com o equilíbrio crescimento:diferenciação, onde os custos ecológicos entre crescimento e defesa variam de acordo com o ambiente (HERMS; MATTSON, 1992).

As estratégias de defesa de plantas podem ser divididas em três grupos: antixenose, antibiose e tolerância. A primeira é expressa geralmente de forma constitutiva e tem como características apresentar cores, odores e texturas que desmotivam o herbívoro de se alimentar da planta. A antibiose pode retardar o desenvolvimento e reprodução de um herbívoro, ferir ou até levar a morte. A tolerância se caracteriza por compensar danos à planta por meio de fatores bióticos e abióticos, não necessariamente interagindo de forma negativa com o herbívoro (KANT et al., 2015).

2.1.1 Defesas constitutivas e induzidas

A teoria da defesa ótima prevê que plantas com recursos limitados organizarão defesas mais ou menos custosas nos tecidos de acordo com o valor de aptidão deles. Além disso, assumindo que as defesas induzidas são geralmente menos “caras” do que as defesas constitutivas, a teoria prevê que os tecidos mais propensos a serem atacados dependerão mais das defesas constitutivas, enquanto os tecidos menos propensos dependerão mais de defesas induzidas (KANT et al., 2015).

A defesa de plantas pode ser do tipo constitutiva, ou seja, está presente no tecido vegetal de forma constante, por exemplo, depósitos cuticulares e espessamento da epiderme aumentam o tempo de alimentação, reduzindo o crescimento e a sobrevivência dos herbívoros, o que acarreta uma maior dificuldade na alimentação dos mesmos (MELLO; SILVA FILHO, 2002; FRANZIN, 2020). Outro exemplo de mecanismo de defesa constitutivo são as culturas geneticamente modificadas resistentes a insetos, como o milho com o gene Bt (*Bacillus thuringiensis*) (MAAGD et al., 1999).

As defesas induzidas são ativadas após um evento de herbivoria, reduzindo a sobrevivência e reprodução do inseto opositor (CHEN, 2008). Após o ataque, sinais físicos e químicos, como elicitores presentes na saliva do herbívoro, se ligam a receptores nas membranas plasmáticas das plantas e o processo de sinalização de defesa induzida é ativado, produzindo compostos químicos de defesa (WU; BALDWIN, 2009).

Muitos desses compostos atuam diretamente sobre os herbívoros, enquanto outros atuam indiretamente atraindo organismos em outros níveis tróficos, protegendo assim as plantas. Uma grande variedade de metabólitos secundários de plantas é tóxica, repelente ou antinutricional para vários herbívoros. Exemplos incluem glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, alcalóides e terpenos, outros são macromoléculas e incluem látex ou inibidores de protease. Os modos de ação incluem ruptura das membranas, inibição do transporte de nutrientes e íons, dos processos de transdução de sinal, do metabolismo ou interrupção do controle hormonal dos processos fisiológicos (MITHÖFER; BOLAND, 2012).

2.2 Defesas químicas de soja: Flavonóides e Isoflavonas

Grande parte das plantas possui uma grande variedade de flavonoides e, embora existam exemplos de convergência quando duas ou mais famílias diferentes possuem flavonoides similares, geralmente os perfis de flavonoides são distintos entre famílias, gêneros e espécies diferentes (HARBORNE; TURNER, 1984). De acordo com Simmonds (2001), o fato dos insetos fitófagos diferirem normalmente entre famílias de plantas sugere que os

flavonoides desempenham um papel importante na seleção de hospedeiros, no entanto ainda não se sabe se é o perfil dos flavonoides ou presença/ausência de outros compostos específicos que determina tal seleção.

Estudos feitos por Bernays et al. (1991) determinaram que a rutina, um dos flavonoides mais estudados, é um fago-estimulante para muitos insetos polívoros, incluindo o gafanhoto *Schistocerca americana*. A resposta comportamental do inseto frente a rutina pode variar dependendo da concentração testada e da idade do inseto. De acordo com Blaney e Simmonds (1983), a rutina em concentrações maiores que 1 mM impossibilitou a alimentação de larvas pré-emergentes das mariposas *Heliothis zea* e *Heliothis virescens*, porém em concentrações menores que 0,1 mM promoveu a alimentação no mesmo estágio.

Na ingestão da rutina, a ligação glicosídica sofre hidrólise e libera a aglicona quercetina, que pode inibir a ATPase mitocondrial (LANG; RACKER, 1974) e oxidases de função mista (MFO) que dependem do citocromo P450 (MITCHELL et al., 1993). Essa inibição possibilita explicar o motivo da rutina ter efeitos nocivos no desenvolvimento de larvas de *H. zea*, *Spodoptera litura* e *Lymantria díspar* (SIMMONDS, 2001).

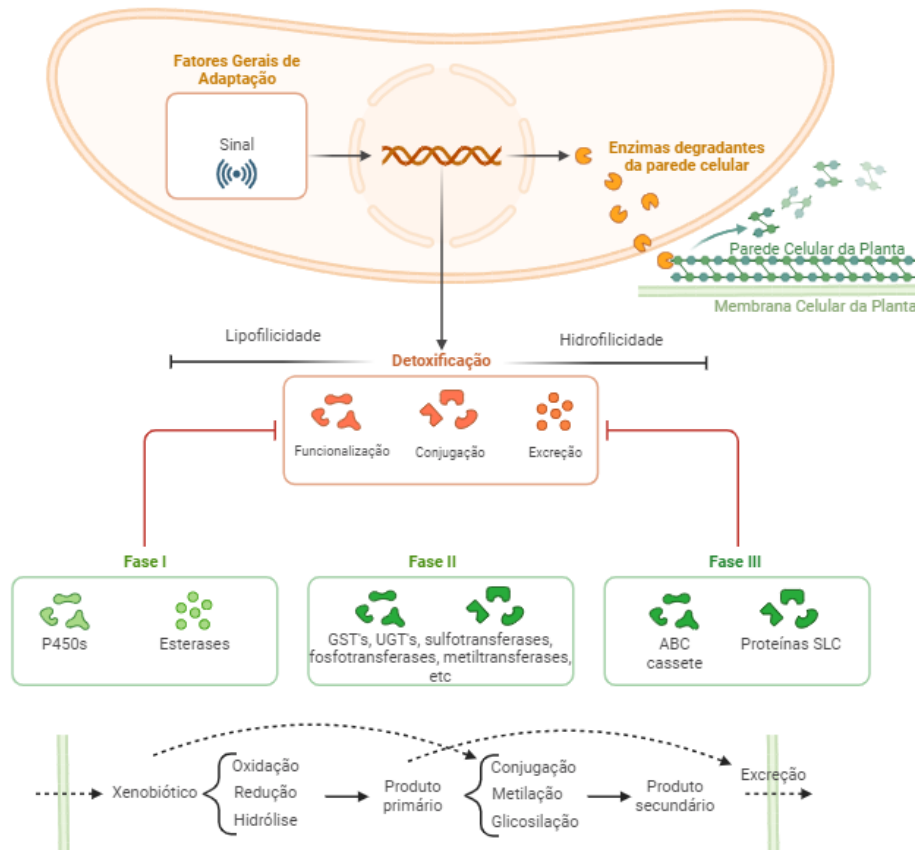
Embora não apresente metabólitos secundários específicos, a soja possui uma variedade de flavonoides e isoflavonas em seus tecidos, que são responsáveis e estão envolvidos com seu mecanismo de defesa contra patógenos e insetos herbívoros (PIUBELLI et al., 2005). A presença e concentração desses metabólitos variam de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta. Logo nos primeiros estágios, são encontrados em maior quantidade os conjugados de genisteína e daidzeína, ambas isoflavonas. Após o terceiro dia, são aparentes também a quercetina e o kaempferol nas folhas de soja (GRAHAM, 1991).

2.3 Resistência dos insetos: Mecanismo de detoxificação

Herbívoros generalistas podem confrontar-se com uma ampla gama de metabólitos secundários tóxicos, excretados por plantas hospedeiras, desenvolvendo diferentes mecanismos para minimizar o efeito dos mesmos, como excreção, mutação no local alvo ou sequestro (HECKEL, 2014; HEIDEL-FISCHER; VOGEL, 2015; KREMPL, 2016). Esses insetos também utilizam mecanismos de detoxificação buscando evitar danos pela toxicidade desses compostos defensivos, que pode ser dividido em três fases. Primeiramente, enzimas como citocromo P450 monooxigenase ou carboxilesterase atuam na toxina, introduzindo ou liberando grupos que aumentam sua hidrofiliabilidade. Na segunda fase, enzimas como glutatona *S*-transferases e UDP-glicosiltransferases conjugam moléculas endógenas às toxinas e esses conjugados formados são mais solúveis em água do que as originais,

acarretando a perda da capacidade de se difundir através das membranas. E por fim, na terceira fase, enzimas como a transportadora ABC (ATP-binding cassette transporter) facilitam o transporte ativo de toxinas nas membranas, permitindo serem excretadas (Figura 2.3.1) (KREMPL, 2016).

Figura 2.3.1 Ilustração das fases de detoxificação realizadas por insetos herbívoros



Fonte: Elaborado pelo autor

Um exemplo de detoxificação é a glicosilação de toxinas, no qual uma aglicona lipofílica será convertida em um conjugado hidrofílico e facilmente excretado. Insetos utilizam UDP-glicose como um doador de açúcar que é transferido pela enzima que está fixada no retículo endoplasmático, a UDP-glicosiltransferase (KREMPL, 2016).

Alguns estudos relataram a participação da UDP-glicosiltransferases na detoxificação de metabólitos secundários de plantas em insetos (KOJIMA et al., 2010; WOUTERS et al., 2014), além das funções endógenas relatadas em estudos anteriores, como o envolvimento no olfato de insetos (BOZZOLAN et al., 2014), pigmentação (HOPKINS; KRAMER, 1992), proteção contra radiação UV (DAIMON et al., 2010) e bronzeamento cuticular (KRAMER; HOPKINS, 1987).

2.4 Gênero *Spodoptera* (Lepdoptera: Noctuidae)

O gênero *Spodoptera* agrega algumas das pragas agrícolas mais polífagas e destrutivas da biodiversidade. A alta capacidade de adaptação a uma grande variedade de plantas hospedeiras garante o sucesso de muitas espécies desse gênero (AMEZIAN; NAUEN; GOFF, 2021). Espécies que se incluem nesse gênero são responsáveis por causar danos a uma grande variedade de cultivos importantes, como milho, algodão, arroz e soja (HUANG et al., 2014; GORDY et al., 2015; KHEDR et al., 2015). Foi observado que esses herbívoros generalistas expostos a uma grande variedade de fitoquímicos ampliaram sua coleção de enzimas de detoxificação em decorrência de um fator evolutivo, permitindo que conseguissem tolerar novos xenobióticos ao modificar para outros hospedeiros (HEIDEL-FISCHER; VOGEL, 2015). Essa diversidade genômica está, na maioria das vezes, agregada nas organizações estruturais dos genes de detoxificação, pelo fato da expansão de muitos desses genes e foram originados de duplicações no número de cópias de algum gene do cromossomo (duplicação em tandem) formando clusters (AMEZIAN; NAUEN; GOFF, 2021).

Até hoje, existem poucos estudos visando compreender a relação entre atividades de oxidases (exemplo: P450) em espécies de *Spodoptera* e a detoxificação de xenobióticos. Yu et al. (2003) relataram variações na atividade de oxidases microssomais e observaram diferentes atividades enzimáticas (CYP e citocromo b5) e redutases no abdômen de cepas suscetíveis de *S. frugiperda*. Neste mesmo estudo, foi observado que oxidases e hidrolases microssomais mostraram as maiores atividades no intestino delgado dessas cepas. Davies et al. (2006) demonstraram que a CYP4L8 é expressa no último instar em *S. littoralis*. Pottier et al. (2012) relataram 37 enzimas P450 expressas nas antenas de *S. littoralis* e concluíram que 8 P450 poderiam ser específicos para os órgãos quimiossensoriais, propondo que as antenas dos insetos participam ativamente do mecanismo para metabolizar uma grande variedade de moléculas exógenas e endógenas, mediado por P450.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

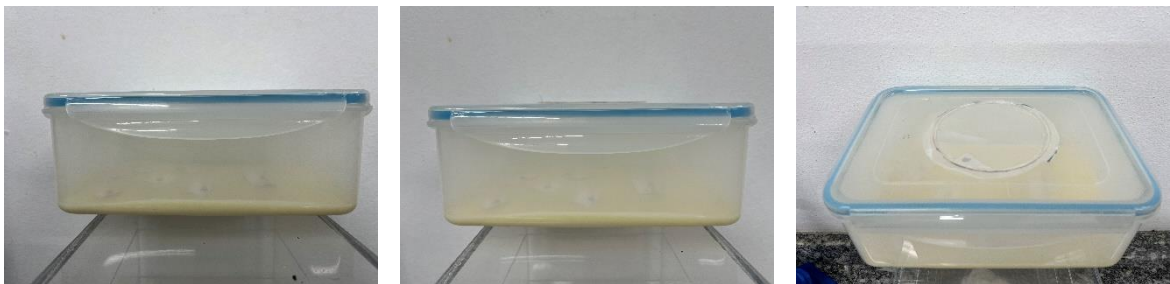
3.1 Aquisição de ovos

Ovos de *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania* foram comprados da empresa Pragas.com, Piracicaba-SP. Estes foram mantidos no Laboratório de Criação de Insetos (DQ - UFSCar) sob condições de temperatura e fotoperíodo controlados ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, ciclo de 12:12h luz/escuro e $60 \pm 5\%$ de umidade) (adaptada de (Jeschke et al., 2016)) e até atingirem uma massa de aproximadamente 40 mg/inseto, no terceiro (3^o) instar, para a administração de dieta enriquecida com compostos de interesse desse estudo. A dieta foi trocada a cada três (3) dias, fazendo a limpeza dos potes no mesmo intervalo de tempo.

3.2 Dieta mínima artificial

A dieta mínima utilizada na criação dos insetos foi preparada utilizando uma proporção de 25 g de farinha de feijão branco, 2,4 g de ágar, 0,45 g de ácido ascórbico, 0,25 g de ácido benzóico, 0,9 mL de solução de vitaminas (Vitagold®) e 0,2 mL de formaldeído 3,7%. Inicialmente, foram misturados a farinha de feijão branco, os ácidos ascórbico e benzóico em 25 mL de água destilada. Ao ágar, foi adicionada uma quantidade de 80 mL de água destilada e fervida em forno micro-ondas até a total dissolução. Em seguida, o ágar foi incorporado à mistura de farinha e ácidos e homogeneizado com um mixer. Com a mistura ainda líquida e morna, foi adicionada a quantidade de formaldeído 3,7% e a solução de vitaminas e incorporados totalmente. Após esse procedimento, parte da dieta mínima foi vertida em potes de plásticos utilizados para a criação dos insetos (figura 3.2.1) e outra parte armazenada em potes de acrílico e guardadas em freezer (-20°C) para serem usadas em procedimentos posteriores.

Figura 3.2.1 Potes plásticos para armazenamento de ovos e criação de neonatos

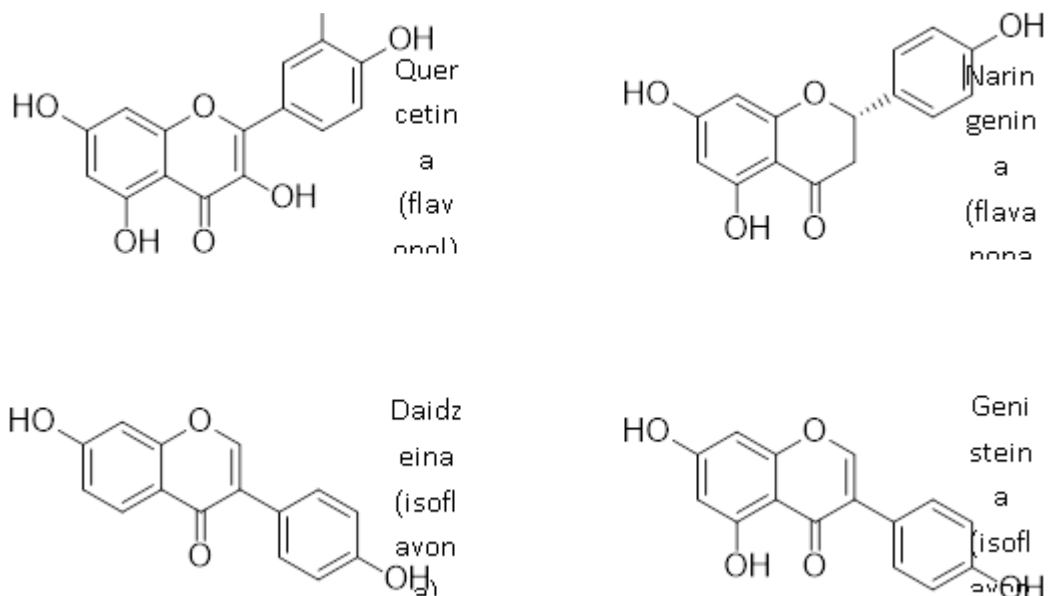


3.3 Ensaios biológicos

As lagartas no terceiro (3^o) instar de cada uma das espécies foram individualizadas em placas de Petri (49x13 mm) e separadas em grupos para a realização dos bioensaios de alimentação (N = 10 indivíduos por tratamento) com dietas artificiais contendo padrões de daidzeína, genisteína, quercetina e naringenina (representados na Figura 3.3.1) na concentração de 2 µmol/g cada, baseando-se no que foi reportado por (Piubelli et al., 2005) e na menor concentração letal de quercetina encontrado por (DELLA NEGRA, 2019). Os compostos foram dissolvidos em etanol e incorporados 20 µL em aproximadamente 300 mg de dieta (cubo de 2.0 cm³) e, após a evaporação do solvente, oferecida a cada uma das espécies durante 5 dias. Ao grupo controle foi adicionado EtOH puro nas mesmas proporções volume/massa dos tratamentos.

As fezes das lagartas submetidas a todos os tratamentos e controle (4T + 1C) foram coletadas no sexto (6^o) dia e armazenadas no freezer (-20°C) para posterior extração e análise cromatográfica.

Figura 3.3.1 Estrutura dos flavonoides utilizados nos bioensaios.

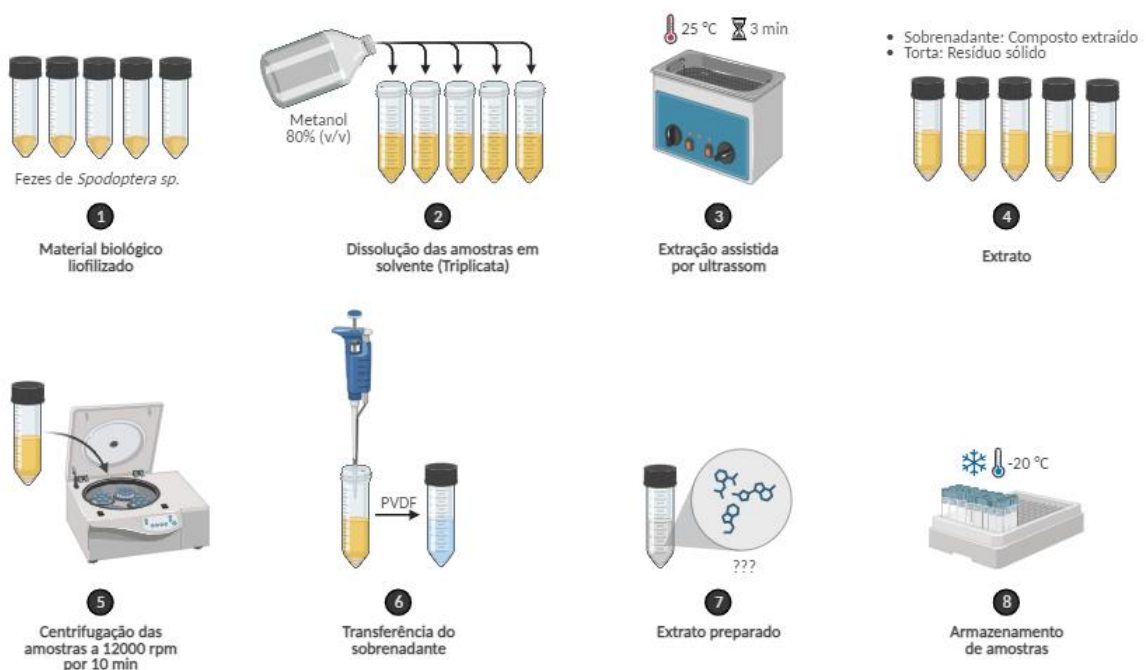


Fonte: Feito pelo autor

3.4 Extração e preparo de amostra

As amostras de fezes excretadas durante o bioensaio foram liofilizadas e os extratos foram preparados com 50 mg de fezes em 1 mL de solução metanol/água 80:20 (v/v) em um microtubo de centrífuga de 2 mL. Posteriormente, os microtubos contendo as fezes foram agitados em um agitador vórtex por 40 segundos, submetidos a um banho no ultrassom (CPX 1800H, 40 khz e 1500 W) durante 3 minutos e centrifugados a 25 °C, 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado um filtro de seringa PVDF (0,20 um) e armazenado em um vial de 1,5 mL para posteriores análises (Figura 3.4.1). Toda a metodologia de extração foi realizada em triplicata.

Figura 3.4.1 Representação esquemática da extração e preparo das amostras



Fonte: Elaboração BioRender©.

3.5 Análises cromatográficas e espectrométricas

Para as análises das amostras obtidas das fezes excretadas durante o bioensaio foi utilizado um equipamento UHPLC Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A - High Speed Pump), auto injetor, compartimento de colunas (G7129B - 1290 Vialsampler) e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G7114B - modelo 1260 Infinity II - VWD) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF Impact HD (Bruker Daltonics - Impact, Rheinstetten, Alemanha).

As análises foram realizadas utilizando um volume de 4 μL por injeção de amostra e uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1x50 mm, 1.8-Micron (μm)) mantida a uma temperatura de 40 °C foi utilizada para a separação. O sistema de eluição da cromatografia foi realizado com fluxo de 0,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em modo reverso, utilizando água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, no seguinte gradiente de eluição: 12% de B na condição isocrática durante 1 min, 12% a 20% de B em 9 min, 20% a 40% de B em 3 min, 40% a 100% de B em 3 min, mantendo a condição de isocrático a 100% de B durante 2 min, em seguida retornando a condição inicial em 12% de B até o tempo 18,10 min e sendo mantida em 12% de B até 20 min para recondicionamento (tabela 3.5.1).

Tabela 3.5.1 - Gradiente de eluição para análise dos metabolitos excretados nas fezes por UHPLC.

Tempo (min)	A% (H₂O)	B% (ACN)
0,00	88	12
1,00	88	12
10,00	80	20
13,00	60	40
16,00	0	100
18	0	100
18,10	88	12
20,00	88	12

Para a espectrometria de massas foi utilizada as condições de ionização por eletrospray (IES ou ESI, do inglês) em modo positivo com varredura de massas na faixa de 100 a 1300 m/z , temperatura do gás de secagem a 180 °C, taxa de fluxo de gás de secagem a 8,0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, pressão do gás nebulizador de 4,0 bar, energia de colisão de 5 eV, tensão do *End Plate* de -450 V, potencial do capilar de 2900 V e energia da câmara de dissociação de 20 a 70 eV, de acordo com a massa do íon precursor (tabela 3.5.2) e as medidas de MS foram calibradas utilizando uma solução de formiato de sódio injetada durante cada corrida.

Os dados de LC-MS/MS foram obtidos pelo *software* Compass Hystar (Bruker Daltonics) e aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o *software* Data Analysis® (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

Os dados obtidos no modo positivo foram utilizados para a construção da rede molecular do tipo *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) e anotação dos compostos. Além disso, cada íon anotado durante a análise da rede molecular foi verificado utilizando os perfis de fragmentação obtidos por LC-MS/MS.

Tabela 3.5.2 - Energias de colisão utilizadas na câmara de dissociação para a formação das fragmentações

Massa (Da)	Energia (eV)
100	20
200	30
300	50
500	60
1300	70

3.6 Processamento dos dados obtidos por LC-MS/MS

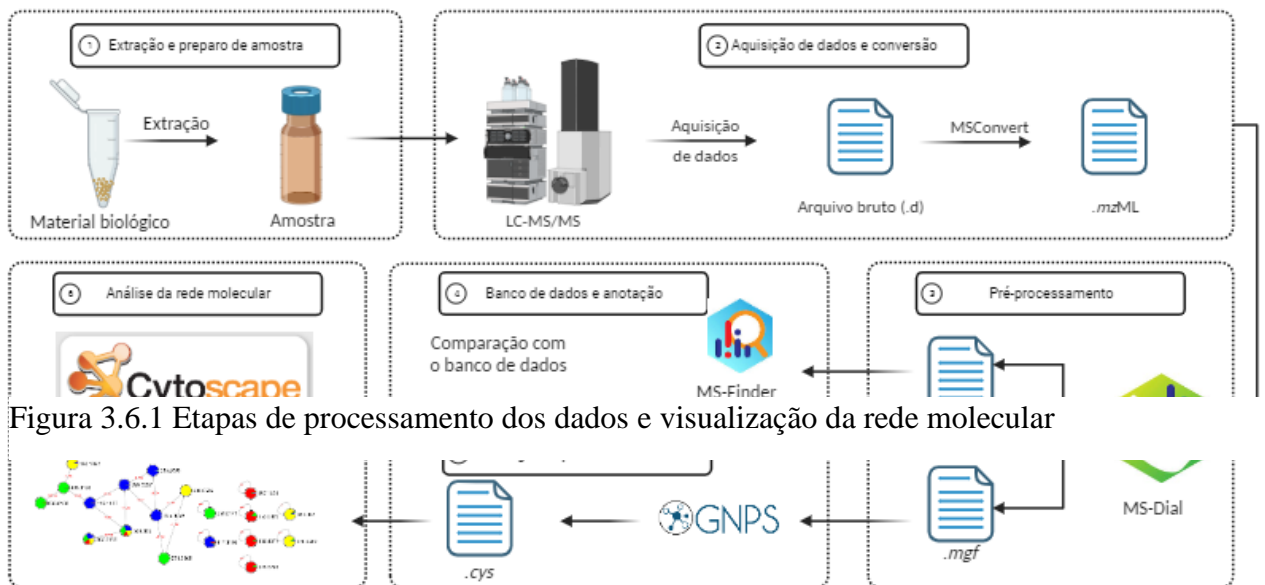
A partir das análises realizadas no espectrômetro de massas (EM, ou MS), foi adquirido uma grande quantidade de dados, que, para a construção de uma rede molecular, precisaram ser organizados no módulo de análise FBMN, até sua visualização e análise (figura 3.6.1). Para isso, os dados brutos adquiridos por LC-MS/MS no modo positivo, utilizando o *software* Data Analysis®, que fornecem os arquivos em uma extensão no formato (.d), necessitaram de conversão para que fossem tratados em um *software* apropriado para o alinhamento dos dados.

Com a utilização do MSConvert, uma ferramenta do grupo ProteoWizard®, todos os arquivos de dados obtidos foram convertidos para o formato (.mzML), com filtro *Peak Picking* e níveis de MS1-2. Após a conversão, os arquivos (.mzML) foram pré-processados, deconvoluídos e alinhados em um único *feature* na ferramenta MS-Dial para a geração de uma matriz de dados única. Para isso, os dados dos íons precursores (MS) quanto dos íons fragmentos (MS/MS) foram convertidos para centroides, com uma tolerância de massa de 0.02

Da para MS e 0.06 Da para MS/MS. Utilizou-se uma intensidade mínima para detecção de 10^3 de amplitude e 30 para a amplitude de abundância de *cutoff* do MS/MS. Os parâmetros de alinhamento foram ajustados para 0.5 min de tolerância em relação ao tempo de detecção e 0.02 Da de tolerância para o MS.

Essa matriz única foi extraída no formato (.msp), compatível com a ferramenta MS-Finder, onde foram geradas anotações por meio de agrupamento de dados por similaridade de íons fragmentos (*clusters*), comparando espectros de referência de banco de dados de metabólitos secundários. Para isso, foram utilizados os seguintes banco de dados: HMDB, Serum, YMDB, FooDB, STOFF, NANPDB, KNApSAcK, Urine, CFS, ECMDB, PlantCyc, BLEEP, COCONUT, PubChem, Saliva, SMPDB, BMDB, ChEBI, NPA, UNPD, Feces, LipidMAPS, DrugBank e T3DB.

Em paralelo, os arquivos foram exportados no formato (.mgf) e submetidos à



plataforma online GNPS© ao fluxo de trabalho FBMN. Os parâmetros escolhidos para o filtro da plataforma foram: tolerância de massa de íons precursores 0.02 Da; tolerância de massa de íons fragmentos 0.06 Da; rede molecular com mínimo de 3 fragmentos semelhantes, mínimo de pares cossenos de 0.7 e 2 para o tamanho mínimo do agrupamento. Em seguida, o FBMN foi exportado para a plataforma Cytoscape© (Watrous et al., 2012) para análise e visualização da rede molecular gerada. Toda metodologia de processamento de dados está sintetizada a seguir (Figura 3.6.1):

Fonte: Adaptado de (SOUZA, 2023)

3.7 Obtenção do cDNA dos insetos

3.7.1 Coleta e preparo de amostra dos tecidos larvais

Lagartas do quinto instar de cada uma das três espécies de *Spodoptera* foram anestesiadas em freezer por cerca de 5 minutos e dissecadas em tampão fosfato (pH 7,0) 10 mM gelado. Para cada indivíduo, o intestino (posterior, médio e anterior) e túbulos de Malpighi foram separados do restante do corpo, sendo removido o conteúdo do intestino e os tecidos lavados em tampão gelado. O restante do corpo (pele, tecido adiposo e músculo) foram lavados em tampão fosfato 10 mM e coletados separadamente do intestino. Tecidos larvais de 2 indivíduos foram coletados em um mesmo criotubo para cada replicata biológica, totalizando 3 replicatas biológicas de cada amostra para cada espécie. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido logo após a dissecação e coleta, sendo posteriormente mantidas a -80 °C até sua extração.

3.7.2 Extração do RNA total e síntese do cDNA

O RNA total das amostras de intestino e restante do corpo de cada espécie foi extraído utilizando o reagente TRI Reagent™ (ThermoFisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, avaliando sua integridade pela razão 260/280 nm. O RNA total foi tratado com DNase I (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante para a remoção de possíveis contaminações com DNA genômico.

As sínteses de cDNA foram feitas a partir de 1 µg de RNA utilizando o kit SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até a realização dos experimentos de PCR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, será abordado a descrição dos dados encontrados em fezes de *Spodoptera sp.* após o tratamento e processamento de dados juntamente com a discussão dos resultados alcançados durante a condução da pesquisa. Além disso, expõe e discute os dados obtidos até o momento através da biologia molecular.

4.2 Anotação dos metabólitos encontrados em fezes de *Spodoptera frugiperda*

A fim de uma melhor compreensão sobre o processo de geração do FBMN, é essencial uma explanação mais detalhada acerca dos softwares empregados, assim como, a forma como essas ferramentas proporcionam os dados e os resultados requeridos até a etapa final da construção da rede molecular.

Os dados brutos resultantes da conversão para o formato *.mzML* por meio do msConvert, conforme ilustrado na figura 4.2.1, foram processados no software MS-Dial. Inicialmente, ocorreu a filtragem dos interferentes presentes no branco e dos espectros de MS/MS adquiridos. Durante o processo de alinhamento dos dados, o software comparou uma quantidade significativa de espectros capturados por segundo durante a análise e agrupou-os, de acordo com uma mesma substância encontrada em diferentes amostras, com base no tempo de retenção (Figura 4.2.2).

Figura 4.2.1 Dados brutos dos compostos anotados adquiridos após a conversão utilizando o msConvert (*.mzML*)

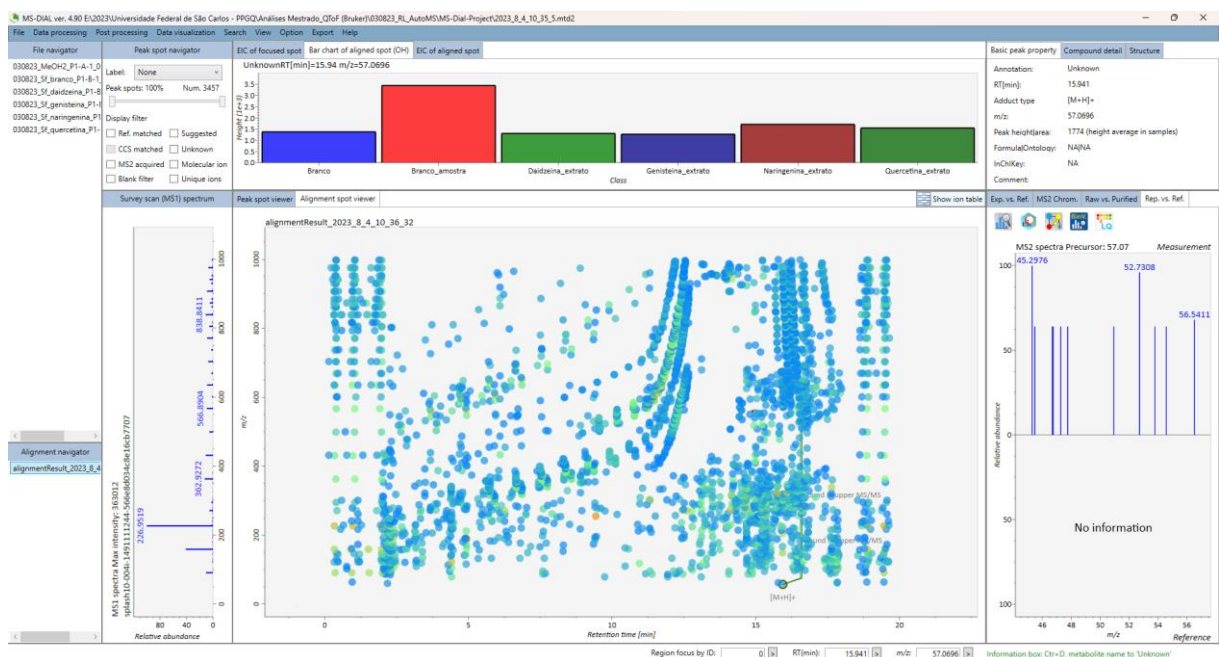
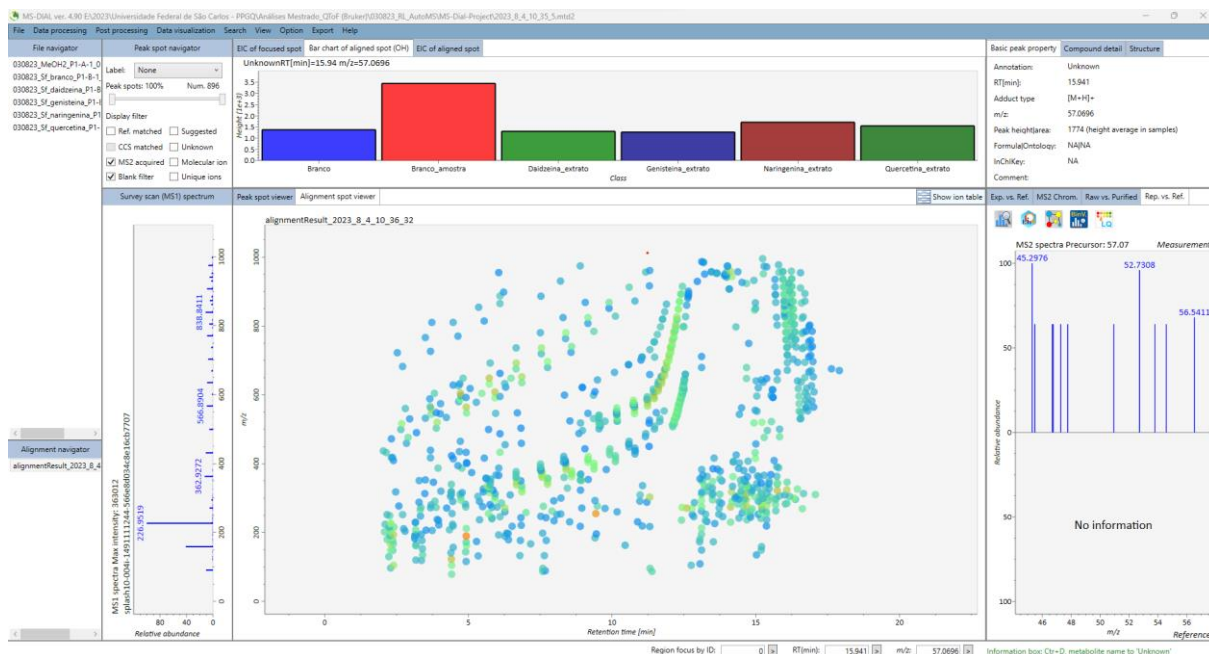


Figura 4.2.2 Filtragem dos interferentes presentes no branco e dos espectros de MS/MS adquiridos após a fase de alinhamento dos dados



Após esse processamento, já se evidenciou uma notável redução nos dados apresentados pelo software. Posterior ao alinhamento, foi gerada uma tabela que continham as informações acerca das substâncias e sua respectiva localização em cada amostra. Esses detalhes foram então exportados para o MS-Finder, onde foram confrontados com bancos de dados selecionados previamente (conforme descrito na seção 3.6) durante o tratamento. Dentro desses bancos de dados, os espectros de MS/MS foram comparados e agrupados por meio de uma paridade com os espectros das bibliotecas e, assim, o programa propôs possíveis classes, fórmulas moleculares, estruturas e, adicionalmente, atribuiu uma pontuação à probabilidade de correspondência com uma determinada classe de compostos, sendo considerados aceitáveis valores acima de 5 (Figura 4.2.3). Além disso, foi fornecida uma comparação entre um espectro experimental e um espectro gerado *in silico* (Figura 4.2.4).

Figura 4.2.3 Interface do software MS-Finder apresentando informações estruturais, possível fórmula, erro, classe e score

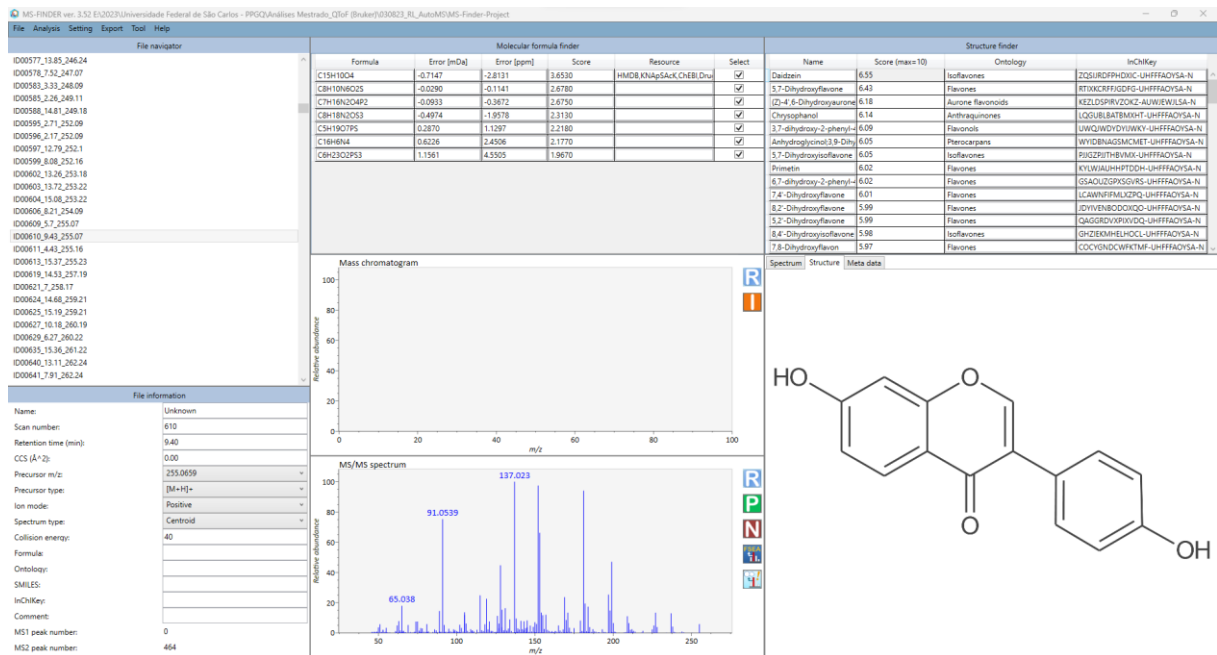
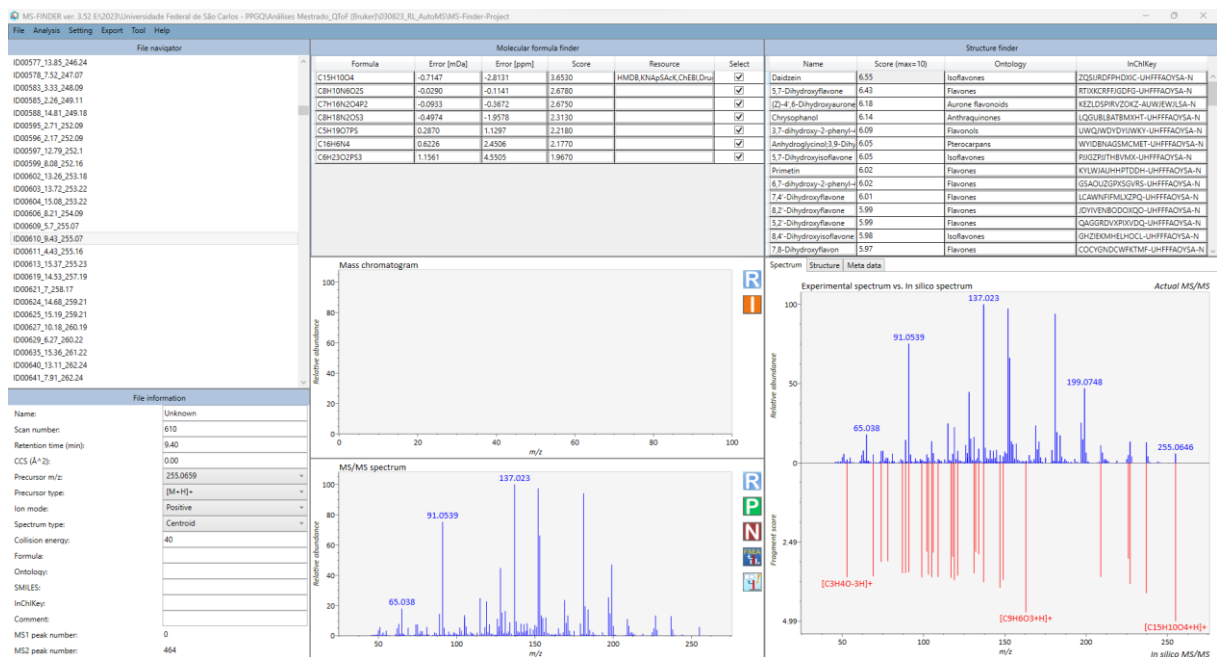


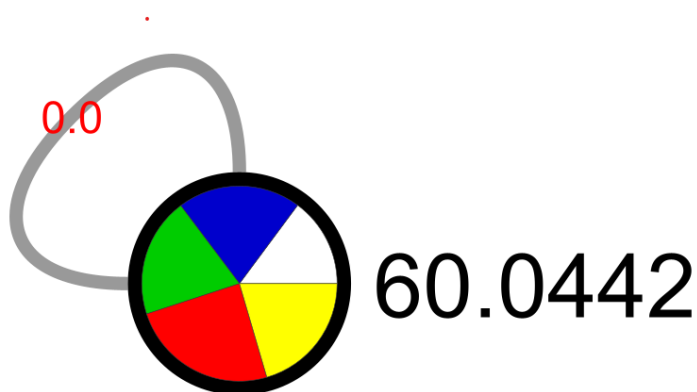
Figura 4.2.4 Interface do software MS-Finder apresentando comparativo do espectro experimental com um *in silico*



Em paralelo ao processamento do MS-Finder, aqueles dados apresentados pelo MS-Dial foram exportados para a plataforma online do GNPS (.mgf), no qual foram agrupados os espectros consensos, comparados pelo MS/MS e o mesmo precursor, formando a rede molecular. Essas, obtidas no modo positivo, foram construídas a partir de nodos que simbolizam cada íon precursor identificado durante a análise dos dados. Cada nodo é visualizado como um gráfico circular (gráfico de pizza), exibindo a distribuição do íon entre

as diversas amostras que foram processadas: as tonalidades em azul, verde, vermelho e amarelo representam, respectivamente, as amostras referentes aos extratos de daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina. A fração em branco indica que o íon foi encontrado nas amostras do branco do extrato ou solvente, sendo uma evidência de um interferente. Como exemplo, foi observado na rede molecular um nodo de m/z 60.0442 com distribuição uniforme de cores, indicando que este íon está presente em todas as amostras, sendo um possível íon oriundo de um contaminante (Figura 4.2.5).

Figura 4.2.5 Representação de um nodo típico de contaminação dado pela presença em todas as amostras, inclusive no branco



Fonte: Cytoscape

A rede molecular resultante das análises de espectrometria de massas (MS/MS) no modo positivo consistiu em 3456 íons precursores para o extrato de *S. frugiperda*, os quais foram apresentados como nodos (interligados ou único). A representação gráfica dessa rede pode ser encontrada na figura A1, presente no apêndice. Além disso, a plataforma GNPS conseguiu anotar um total de 36 substâncias, proporcionando uma abrangente visualização dos compostos presentes nos extratos dos respectivos compostos de tratamento. Vale ressaltar que, dentre esses compostos anotados pelo GNPS, apenas 7 substâncias foram consideradas como de interesse para a discussão dos resultados dessa subseção. Além disso, mais 9 substâncias, que não foram anotadas, foram consideradas como sendo derivados de compostos com núcleo flavânico. As anotações dos compostos foram organizadas de acordo com o composto administrado na dieta artificial de *S. frugiperda* e estão descritas na tabela 4.2.1.

Vale ressaltar que, apesar da análise cuidadosa dos dados obtidos nas anotações dos compostos, as atribuições ainda são anotações putativas e que, para uma caracterização inequívoca dos compostos, serão apresentadas análises adicionais que incluem propostas de fragmentação e comparações com alguns padrões.

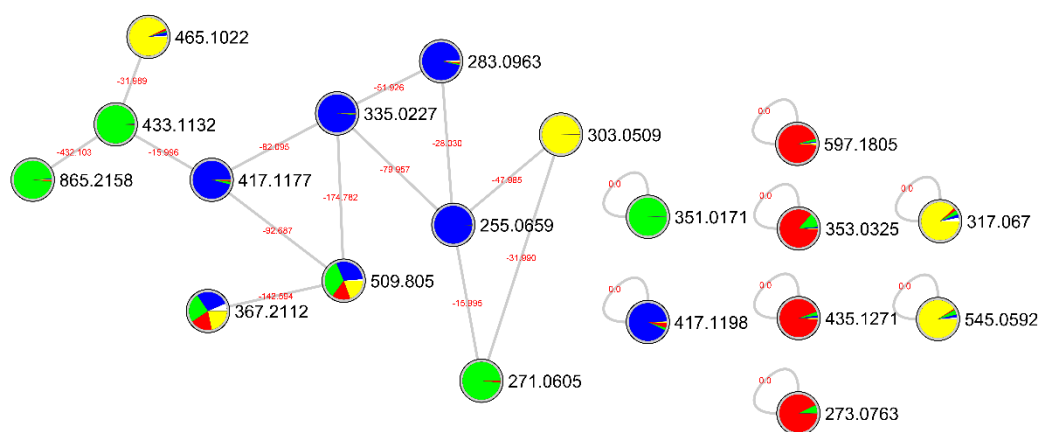
Tabela 4.2.1 Anotação putativa dos compostos encontrados em fezes de *S. frugiperda* utilizando a técnica de LC-MS/MS

N°	t _R (min)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação
			MS	Erro (ppm)	MS/MS	
Daidzeina - Cor azul						
1-Sf	2.32	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.1179 [M+H] ⁺	-0.24	255.06; 237.05; 227.07; 199.07; 145.03; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'-O-glicosilada
2-Sf	3.68	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.1187 [M+H] ⁺	1.68	255.06; 237.05; 227.07; 199.07; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'-O-glicosilada
3-Sf	5.65	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ S	335.0220 [M+H] ⁺	0.00	255.06; 237.06; 227.07; 199.08; 145.03; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'-O-sulfatada
4-Sf	14.37	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	283.0964 [M+H] ⁺	-0.35	255.06; 237.06; 227.07; 199.07; 157.06; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'-etilada
Genisteina - Cor verde						
5-Sf	6.10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1127 [M+H] ⁺	-0.46	271.06; 253.05; 243.07; 197.06; 215.07; 153.02	Genisteina O-glicosilada
6-Sf	8.85	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	351.0168 [M+H] ⁺	-0.28	271.06; 253.05; 243.06; 153.02	Genisteina O-sulfatada
Naringenina - Cor vermelha						
7-Sf	4.69	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.1261 [M+H] ⁺	-5.74	273.07; 251.08; 153.02	Naringenina O-glicosilada
8-Sf	4.74	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	597.1836 [M+H] ⁺	3.68	273.07; 219.03; 171.03; 153.02	Naringenina O-diglicosilada
9-Sf	8.91	C ₁₅ H ₁₂ O ₈ S	353.0317 [M+H] ⁺	-2.55	189.07; 171.03; 153.02	Naringenina O-sulfatada

N°	t _R (min)	Fórmula molecular	Íons característicos (<i>m/z</i>)			Anotação
			MS	Erro (ppm)	MS/MS	
Quercetina - Cor amarela						
10-Sf	4.72	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1013 [M+H] ⁺	-3.23	303.05; 285.04; 257.04; 247.06; 229.05; 201.05; 153.02; 137.02	Quercetina <i>O</i> -glicosilada
11-Sf	4.02	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₅ S	545.0582 [M+H] ⁺	-2.57	303.05; 285.04; 201.05; 153.02	Quercetina sulfo- glicosilada
12-Sf	13.12	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.0638 [M+H] ⁺	-5.68	302,04; 285.04; 229.05; 228.04; 201.05; 153.02; 95.05	Quercetina metilada

O *cluster* analisado (Figura 4.2.6) é constituído por 19 nodos, sendo que, dentre eles, apenas 16 nodos são representativos para os padrões administrados e seus respectivos derivados bioconvertidos pela espécie *S. frugiperda*. Vale ressaltar que os íons de m/z 509.8050 e 367.2112 foram encontrados em todos os extratos de fezes de *S. frugiperda*, sendo considerados possíveis interferentes (Figuras A2-A9).

Figura 4.2.6 *Cluster* dos padrões e seus respectivos derivados biotransformados pela espécie *S. frugiperda* presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras de daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente.



4.2.1 Anotação dos metabólitos *O*-glicosilados encontrados em fezes dos insetos de *S. frugiperda*

O *cluster* inicialmente analisado (*cluster* N1; Figura 4.2.1.1) é composto por 11 nodos, sendo 9 que representam derivados biotransformados de *S. frugiperda*. Os íons m/z 417.12 (isômeros m/z 417.1177 e 417.1198) foram detectados em tempos de retenção diferentes, $t_R = 2.3$ e 3.7 min, respectivamente, sendo o primeiro pertencente ao *cluster* N1 e o segundo sendo observado como *cluster* de nodo único (*cluster* N2; Figura 4.2.1.2). Esses íons correspondem a um metabólito com fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_9$, que é um derivado da daidzeina. No entanto, apenas um desses isômeros foi o anotado pela plataforma GNPS como a daidzeina 7-*O*-glicosídeo (daidzina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS, o *mirror match*, está detalhada na Figura A10 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A11 e A16.

O íon m/z 433.1132 foi anotado como genisteína 7-*O*-glicosídeo (genistina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS está detalhada na Figura A12 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A13.

O íon m/z 465.1022 foi anotado como quercetina 3-*O*-glicosídeo (isoquercetina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS está detalhada na Figura A14 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A15.

Os íons m/z 435.1271 e 597.1805 correspondem a metabólitos de fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_{10}$ e $C_{27}H_{32}O_{15}$, respectivamente, que são derivados da naringenina. No entanto, eles não foram anotados pela plataforma GNPS. Esses dois íons foram observados como *cluster* de nodo único (*cluster* N3; Figura 4.2.1.3 e *cluster* N4; Figura 4.2.1.4, respectivamente).

Além da assistência da rede molecular na anotação dos compostos, a análise dos flavonoides glicosilados baseou-se principalmente na observação dos espectros de MS/MS dos íons e nas perdas neutras de 162.05 Da, que resultam na formação dos íons fragmentos das agliconas. Essas perdas indicam a presença de resíduo de hexose (Lyu et al., 2021; Yoshioka, 2021).

Para o íon m/z 865.2158, embora seja consistente com um dímero glicosilado derivado de uma genisteína, foi sugerido a formação na fonte de ionização do espectrômetro de massas por conta do seu padrão isotópico, possivelmente devido a uma alta energia de ionização. Desta forma, não o foi levado em consideração para a discussão desses resultados.

Figura 4.2.1.1 *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N1) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

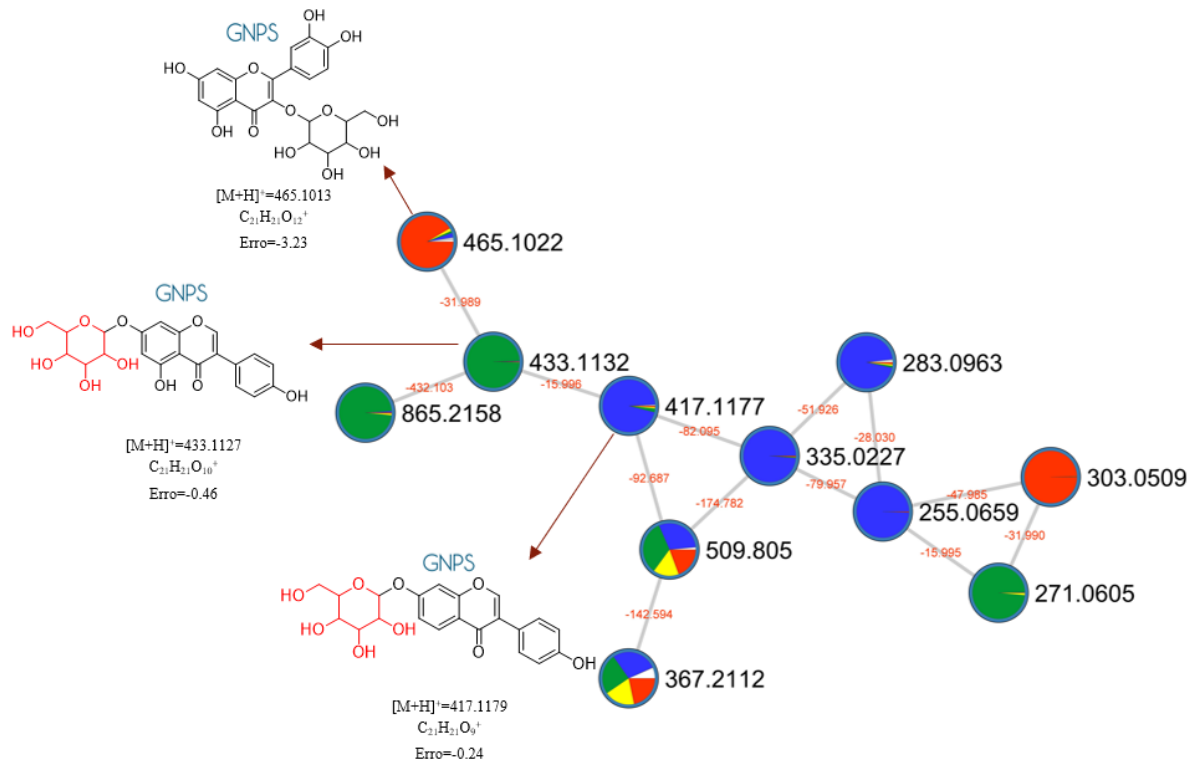


Figura 4.2.1.2 *Cluster* de nodo único (N2) formado pelo íon m/z 417.12, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

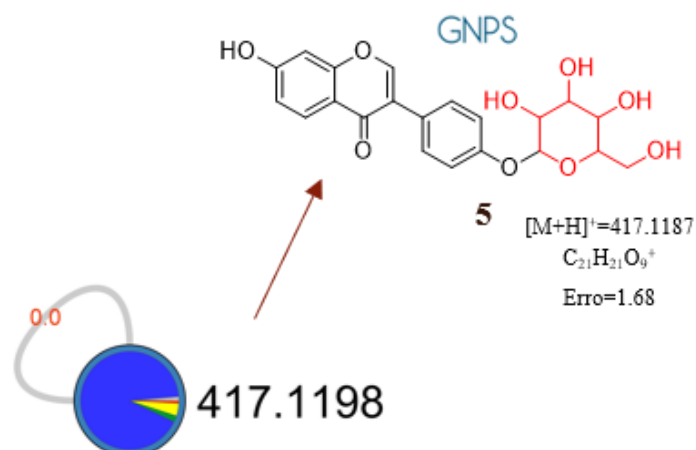


Figura 4.2.1.3 *Cluster* de nodo único (N3) formado pelo íon m/z 435.1271, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

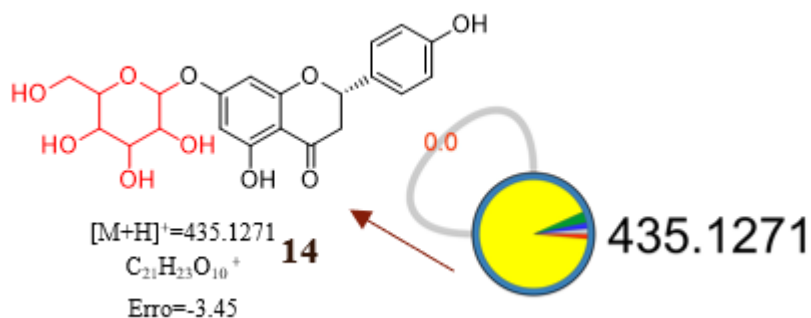
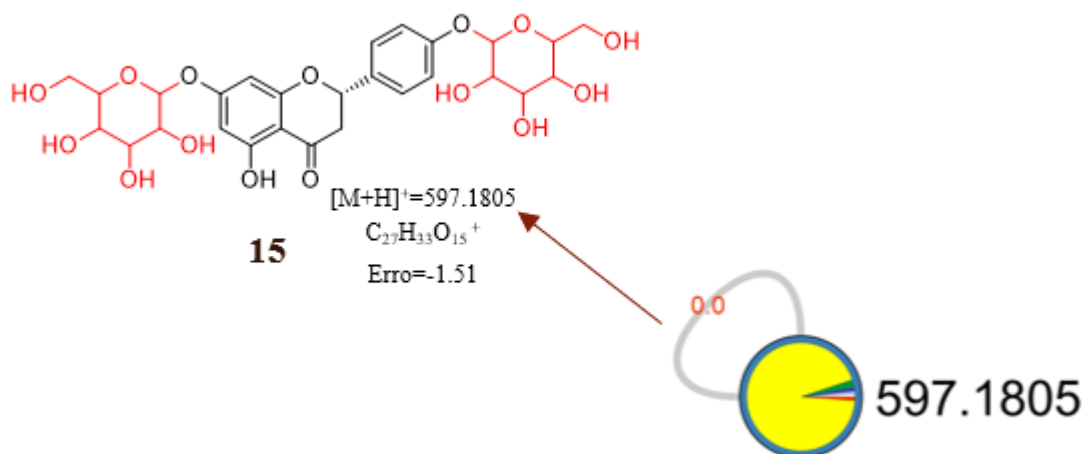


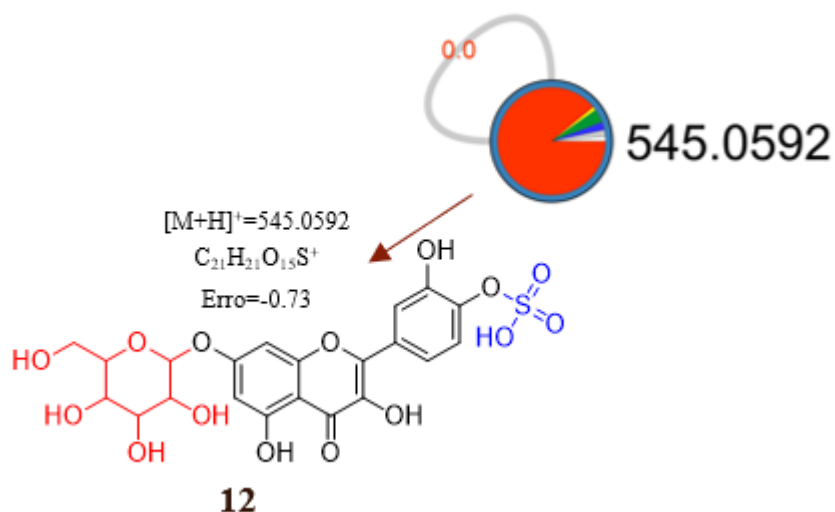
Figura 4.2.1.4 *Cluster* de nodo único (N4) formado pelo íon m/z 597.1805, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.2.2 Anotação dos metabólitos sulfo-glicosilados encontrados em fezes dos insetos de *S. frugiperda*

Formado por um nodo único, o *cluster* N5 (Figura 4.2.2.1) que compreende os metabólitos sulfo-glicosilados apresentou um íon de m/z 545.0592 que corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{15}S$ que é derivado de quercetina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS.

Figura 4.2.2.1 *Cluster* de nodo único (N5) formado pelo íon m/z 545.0592, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.2.3 Anotação dos metabólitos sulfatados encontrados em fezes dos insetos de *S. frugiperda*

Analisando o *cluster* geral dos padrões (Figura 4.2.6), observamos a presença do íon de m/z 335.0220 no *cluster* N1 (Figura 4.2.1.1) pelo fato de, após a perda das unidades glicose (nos derivados glicosilados) e sulfato, apresentarem padrões de fragmentação semelhantes. Contudo, esse íon não foi anotado pela plataforma GNPS e corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7S$ que é um derivado da daidzeína. A Figura 4.2.3.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

Os íons m/z 351.0168 e 353.0317 correspondem a um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_8S$ e $C_{15}H_{12}O_8S$, respectivamente, que são derivados da genisteína e da naringenina, respectivamente. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. Esses dois íons foram observados como *cluster* de nodo único (*cluster* N6; Figura 4.2.3.2 e *cluster* N7; Figura 4.2.3.3, respectivamente).

Figura 4.2.3.1 *Cluster* N1 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 335.0220 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

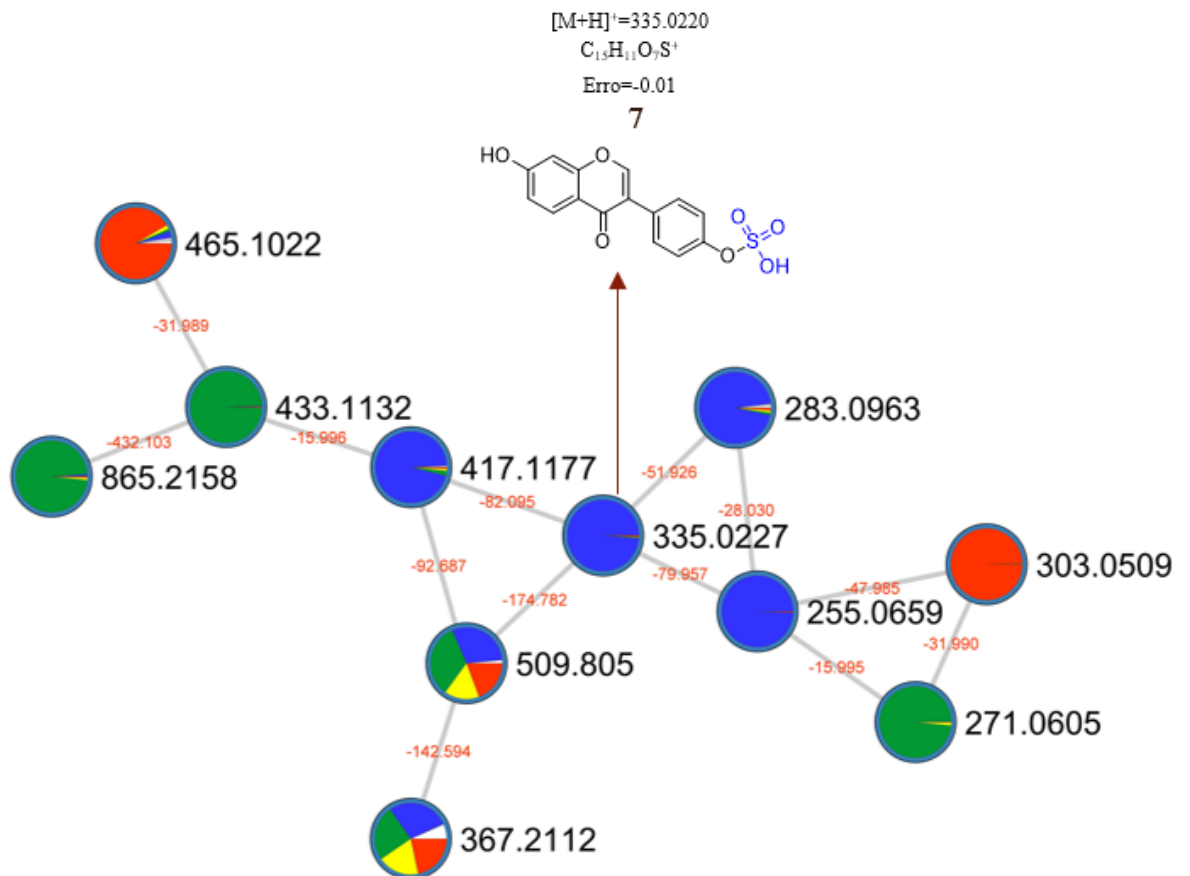


Figura 4.2.3.2 *Cluster* de nodo único (N6) formado pelo íon m/z 351.0171, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

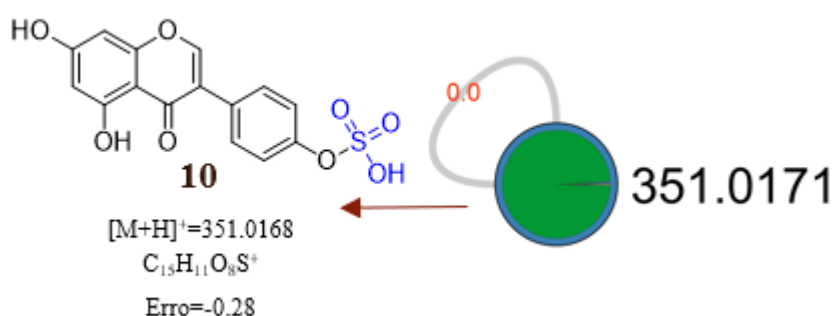
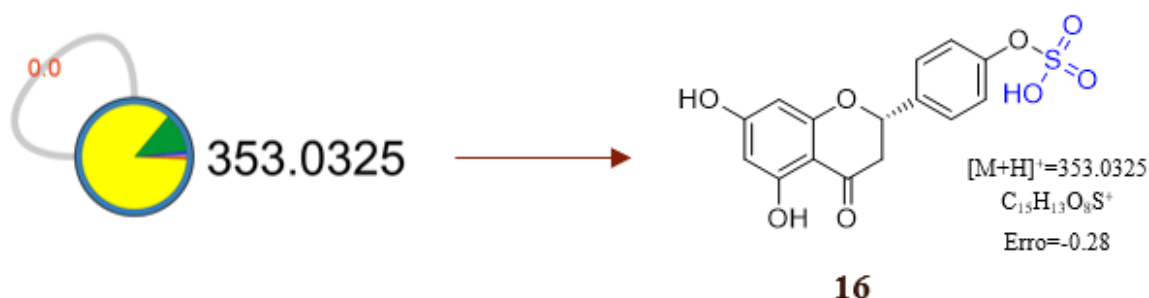


Figura 4.2.3.3 *Cluster* de nodo único (N7) formado pelo íon m/z 353.0325, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.2.4 Anotação dos metabólitos alquilados encontrados em fezes dos insetos de *S. frugiperda*

Analisando o *cluster* geral dos padrões (Figura 4.2.6), observamos a presença do íon de m/z 283.0964 no *cluster* N1 (Figura 4.2.1.1), contudo, esse íon não foi anotado pela plataforma GNPS e corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_4$ que é um derivado da daidzeína. A Figura 4.2.4.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

O íon m/z 317.0670 corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$, que é derivado da quercetina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. Esse íon foi observado como *cluster* de nodo único (*cluster* N8; Figura 4.2.4.2).

Figura 4.2.4.1 *Cluster* N1 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 283.0964 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

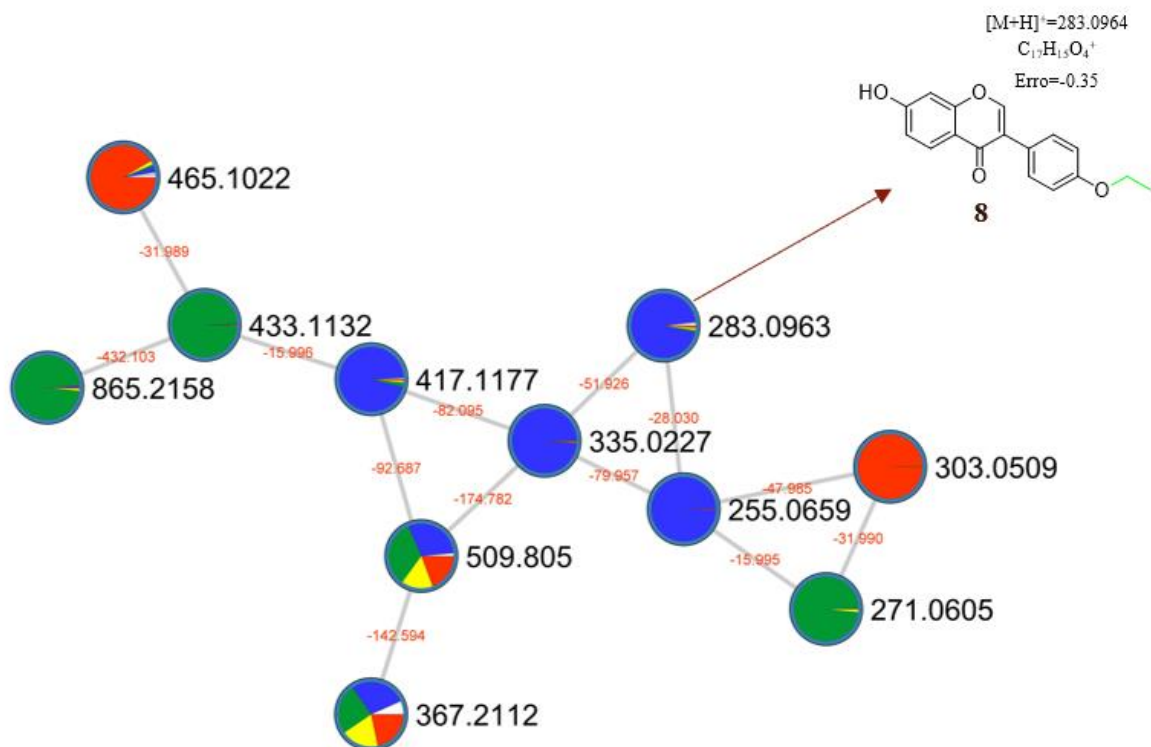
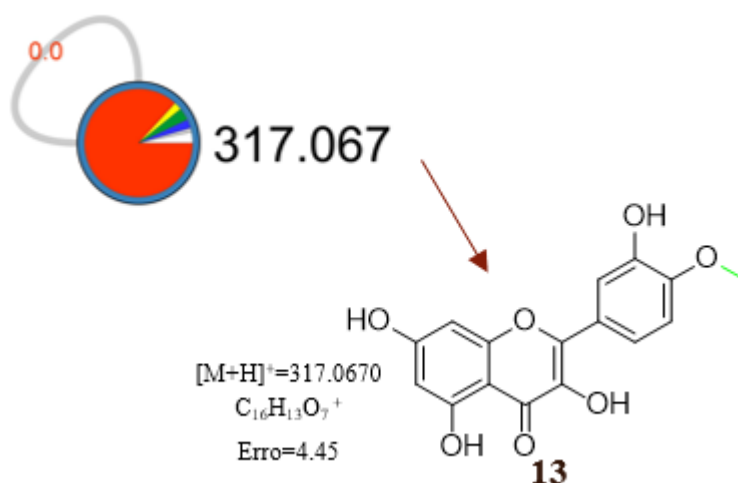


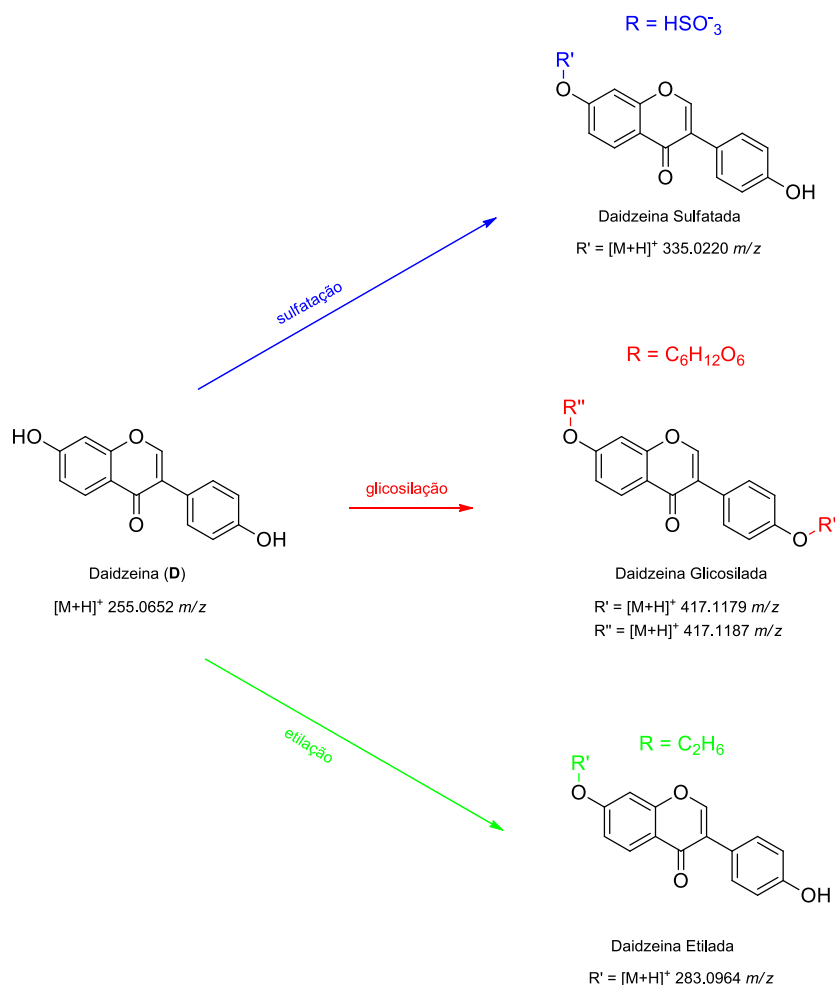
Figura 4.2.4.2 *Cluster* de nodo único (N8) formado pelo íon m/z 317.0670, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.3 Estudo dos padrões de fragmentação observados em derivados dos padrões de flavonoides administrados em dieta artificial

4.3.1 Derivados de daidzeína em extrato de fezes de *Spodoptera frugiperda*

Nos extratos de fezes de *S. frugiperda* alimentados com padrão de daidzeína foram encontrados derivados mono-glicosilados, sulfatado e alquilado oriundos da biotransformação metabólica (detoxificação). O Esquema 4.3.1.1 apresenta os metabólitos encontrados nos extratos de fezes de *S. frugiperda*. Vale ressaltar que, para alguns metabólitos, não foi possível fazer a identificação exata, utilizando apenas cromatogramas e espectros de massa, das modificações na posição da estrutura da aglicona, sendo necessária a utilização de outras técnicas em trabalhos futuros, como a utilização de Ressonância Magnética Nuclear e/ou co-injeções com padrões de cada um desses derivados. As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.2.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.



ESQUEMA 4.3.1.1 Estruturas representativas dos metabólitos de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina

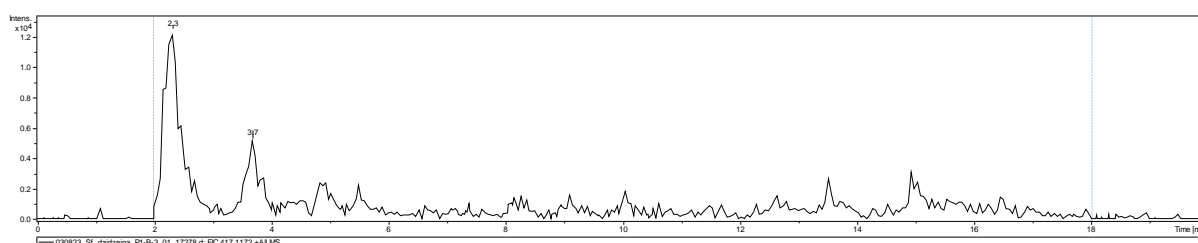
4.3.1.1 Derivados glicosilados de daidzeina

Os picos cromatográficos apresentados na figura 4.3.1.1.1 foram atribuídos a glicosídeos de daidzeina devido à presença do íon de m/z 417.1179 ($t_R=2.3$) e 417.1187 ($t_R=3.7$) no espectro de EIC (Extracted Ion Chromatogram), que correspondem ao $[M+H]^+$ de isômeros de daidzeina glicosilada, assim como, à presença da fragmentação 255.06, correspondente a aglicona daidzeina, no espectro de MS/MS dos dois íons (Figura A11 e A16, respectivamente). Desta forma, observando os tempos de retenção (t_R) baixos para esses isômeros e os fatos apresentados anteriormente, sugere-se a presença de mono-glicosídeos na amostra.

Os perfis cromatográficos apresentados pelos mono-glicosídeos ($t_R=2.3$ e $t_R=3.7$), juntamente com o fato de não serem observadas quebras parciais dos açúcares nos respectivos espectros de massa, caracterizando a presença apenas de *O*-glicosídeos (COLOMBO et al.,

2006), sugerem a presença de um par de isômeros, com substituições na posição 7 e 4'. É importante salientar que, embora seja possível identificar que existe um par de isômeros na amostra, as ilustrações das posições referentes a cada uma das glicosilações (Esquema 4.3.1.1; Pág. 32) são representativas, não sendo possível concluir sem a co-injeção de um padrão ou análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), qual a posição de substituição para cada isômero.

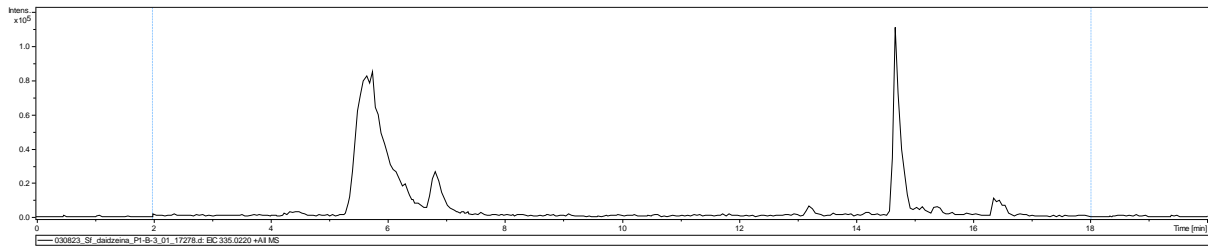
Figura 4.3.1.1.1 Cromatograma de EIC para os mono-glicosídeos de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina



4.3.1.2 Derivados sulfatados de daidzeina

O pico cromatográfico ($t_R=5.5$) apresentado na figura 4.3.1.1.2 foi atribuído a um derivado sulfatado de daidzeina devido à presença do íon de m/z 335.0220 no espectro de EIC, assim como, à presença da fragmentação 255.06 que corresponde a perda da unidade sulfato (79.96 Da) no espectro de MS/MS desse íon (Figura A17). Além disso, revela algumas informações estruturais que levam a confirmar que o íon é um derivado sulfatado de daidzeina, como a presença da fragmentação 137.02 relativa a Retro-Diels-Alder (RDA)($^{1,3}A^+$) sofrida pelo esqueleto da aglicona e as fragmentações 237.06, 227.07 e 199.08 relativas a perda neutra de água ($M+H-H_2O$) e dupla perda de CO ($M+H-2CO$), respectivamente (Franco, D. C., 2021; Hong et al., 2011). Quando comparado com o tempo de retenção dos compostos glicosilados, percebe-se que para o derivado sulfatado o tempo de retenção é coerente com o já esperado, eluindo antes da daidzeina e depois dos isômeros glicosilados (Zhou et al., 2011).

Figura 4.3.1.2.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfatado de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina



4.3.1.3 Derivados alquilados de daidzeina

Em 14.3 min dos cromatogramas dos extratos de fezes de *S. frugiperda*, observou-se a presença de um pico cromatográfico que foi atribuído a um derivado alquilado de daidzeina devido à presença do íon de m/z 283.0964 no espectro de EIC, assim como, à presença da fragmentação m/z 255.07 que corresponde a perda neutra da unidade etila (28.04) e da fragmentação m/z 256.07 que corresponde a perda radicalar de uma etoxila no espectro de MS/MS desse íon (Figura A18).

Em trabalhos anteriores, alguns autores já discutiram as propriedades antioxidantes dos flavonoides em sistemas biológicos relacionadas com sua estrutura. Essas características podem ser justificadas pela presença de anéis aromáticos conjugados na estrutura desses flavonoides, acompanhados por grupos carbonila e hidroxila. A deslocalização eletrônica gerada pela intensa conjugação proporcionada por essas funcionalidades contribui para a estabilização de radicais adquiridos (DELLA NEGRA, B. L., 2019).

Na figura 4.3.1.3.2 é possível observar um possível caminho de fragmentação iniciando com a perda radicalar de uma etila para dar o íon fragmento m/z 256.07. Demarque et al. (2016) mostraram que o processo mais comum para uma fragmentação radicalar é a eliminação de um grupo radical metoxila em flavonoides, antraquinonas e terpenoides. Além disso, expuseram análises experimentais e computacionais para calcular as energias de eliminação radicalar de um hidrogênio radical e um radical metoxila em isoflavonoides. As espécies radicais se formam acima de uma energia de 20 eV, justificando a fragmentação radicalar de um grupo radical etoxila neste trabalho, já que uma energia de 30 eV para moléculas maiores que 300 Da.

Figura 4.3.1.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado alquilado de daidzeina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina

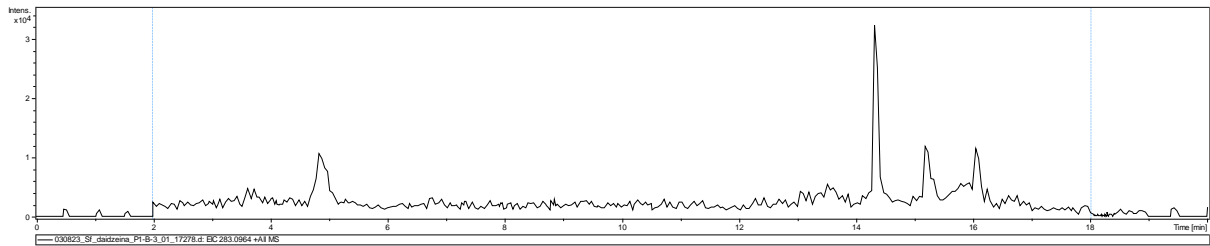
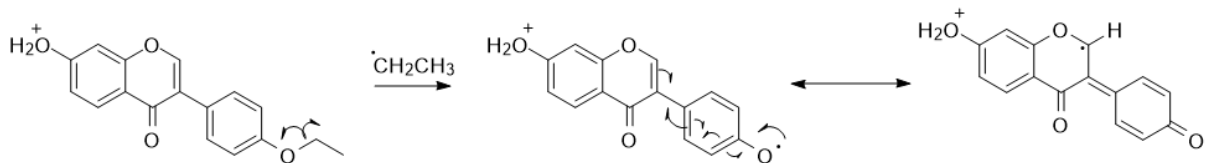
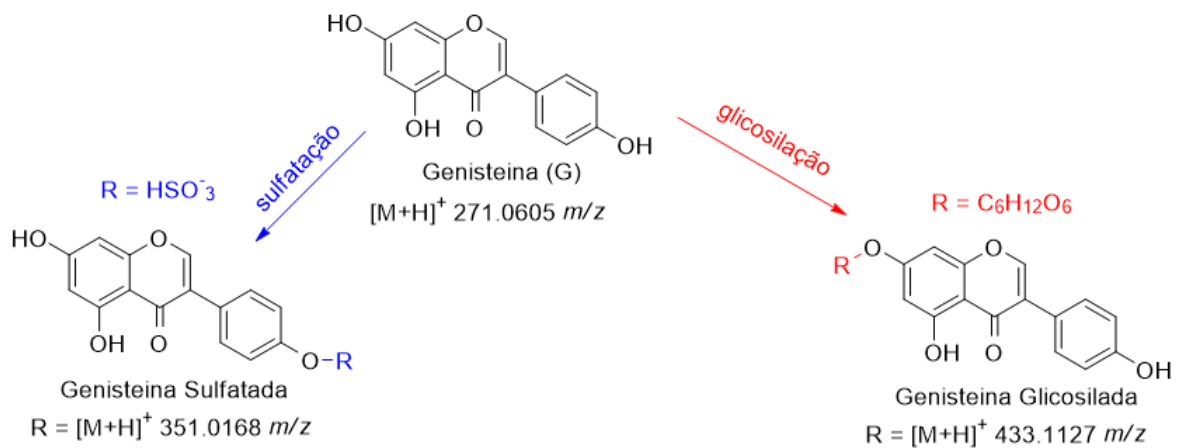


Figura 4.3.1.3.2 Proposta de fragmentação radicalar para o derivado alquilado de daidzeina



4.3.2 Derivados de genisteina em extrato de fezes de *S. frugiperda*

Nos extratos de fezes de *S. frugiperda* alimentados com padrão de genisteina foram encontrados derivados mono-glicosilado e sulfatado oriundos da biotransformação metabólica (detoxificação). O Esquema 4.3.2.1 apresenta os metabólitos encontrados nos extratos de fezes de *S. frugiperda*. Vale ressaltar que, para alguns metabólitos, não foi possível fazer a identificação exata, utilizando apenas cromatogramas e espectros de massas, das modificações na posição da estrutura da aglicona, sendo necessária a utilização de outras técnicas em trabalhos futuros. As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.2.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.

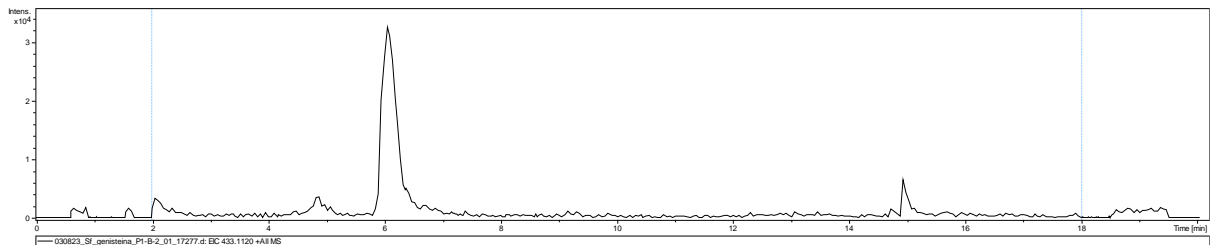


ESQUEMA 4.3.2.1 Estruturas representativas dos metabólitos de genisteína em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de genisteína

4.3.2.1 Derivado glicosilado de genisteína

O metabólito glicosilado de genisteína foi detectado em $t_R=6.0$ min (Figura 4.3.2.1.1). O tempo de retenção está em conformidade com as relações previamente observadas entre os flavonoides glicosilados e suas agliconas correspondentes, sendo aqueles mais polares ((DELLA NEGRA, B. L., 2019).

Figura 4.3.1.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado glicosilado de genisteína em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de genisteína

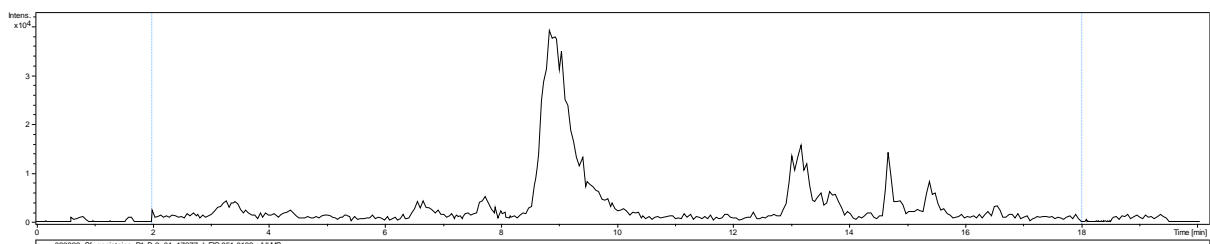


Na Figura A19, os espectros de MS/MS do metabólito em análise são exibidos. A partir do íon m/z 433.1127, as fragmentações com m/z 271.06 e 153.02 são geradas pela perda neutra de uma glicose e pela Retro-Diels-Alder (RDA), respectivamente.

4.3.2.2 Derivado sulfatado de genisteína

Em 8.9 min, é observado um pico cromatográfico correspondente à genisteína sulfatada (Figura 4.3.2.2.1). O tempo de retenção está conforme o esperado, ocorrendo antes da eluição da aglicona genisteína e depois do derivado glicosilado da mesma (Della Negra B L, 2019; Zhou et al., 2011).

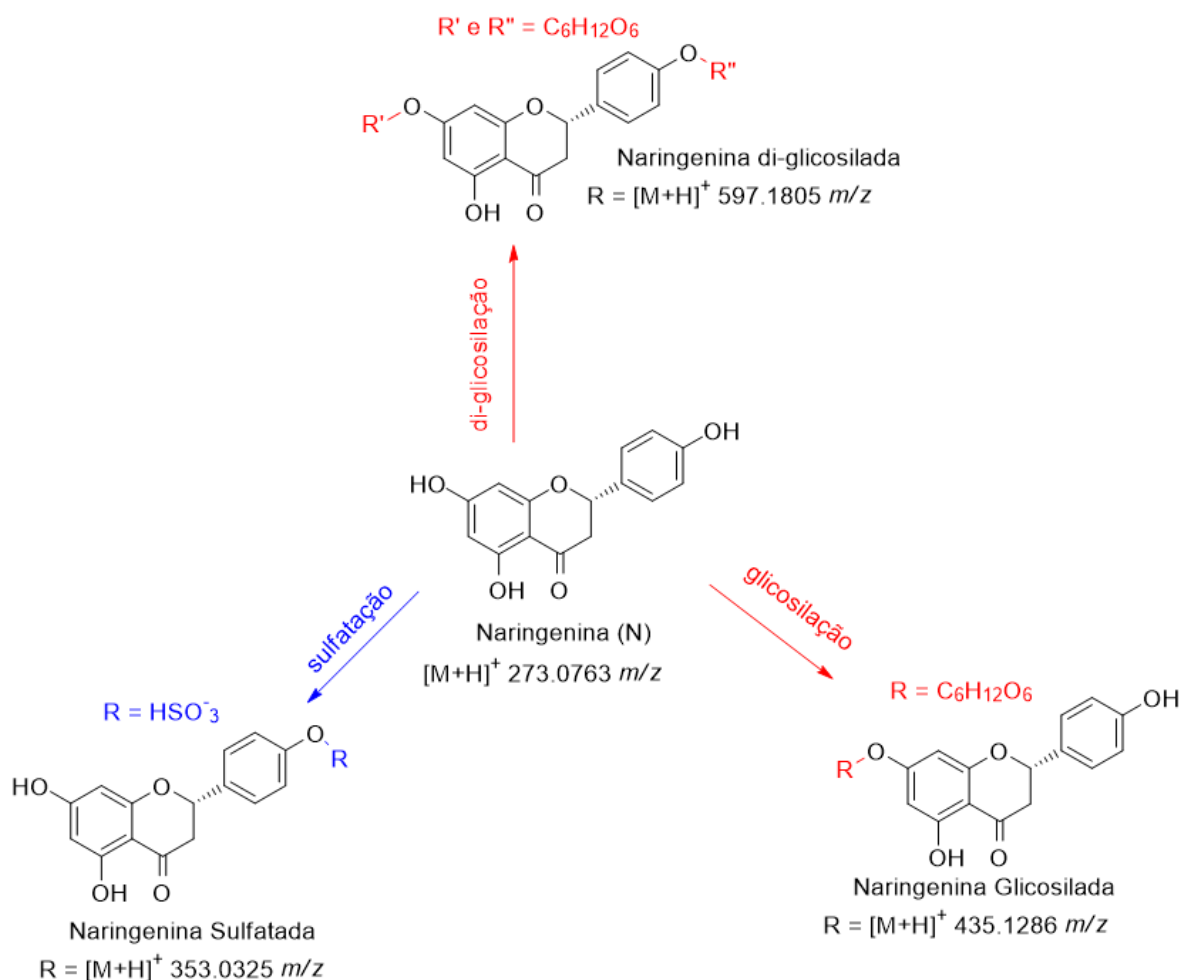
Figura 4.3.1.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfatado de genisteína em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de genisteína



O espectro de MS/MS (Figura A20) fornece algumas informações estruturais que confirma ser um derivado da bioconversão de um flavonoide, como a presença da fragmentação relativa à perda do grupo sulfato (m/z 271.06), à reação de Retro-Diels-Alder (RDA) no esqueleto da aglicona (m/z 153.02) e outras características de flavonoides (m/z 253.05 (M+H-H₂O); 243.06 (M+H-CO); 215.07 (M+H-2CO); 227.06 (M+H-CO₂)) (QIU et al., 2022).

4.3.3 Derivados de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda*

Nos extratos de fezes de *S. frugiperda* alimentados com padrão de naringenina foram encontrados derivados mono-glicosilado, di-glicosilado e sulfatado oriundos da biotransformação. O Esquema 4.3.3.1 apresenta os metabólitos encontrados nos extratos de fezes de *S. frugiperda*. Vale ressaltar que, para alguns metabólitos, não foi possível fazer a identificação exata, utilizando apenas cromatogramas e espectros de massa, das modificações na posição da estrutura da aglicona, sendo necessária a utilização de outras técnicas em trabalhos futuros. As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.2.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.

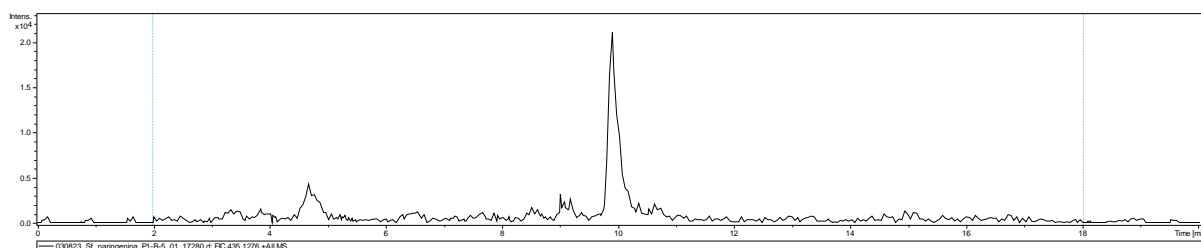


ESQUEMA 4.3.3.1 Estruturas representativas dos metabólitos de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina

4.3.3.1 Derivado mono-glicosilado de naringenina

A Figura 4.3.3.1.1 apresenta o pico cromatográfico do metabólito mono-glicosilado observado em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentados com naringenina. O tempo de retenção ($t_R=4.7\text{min}$) desse composto está dentro do esperado para derivados glicosilados, sendo menor que o t_R da aglicona naringenina.

Figura 4.3.3.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado mono-glicosilado de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina

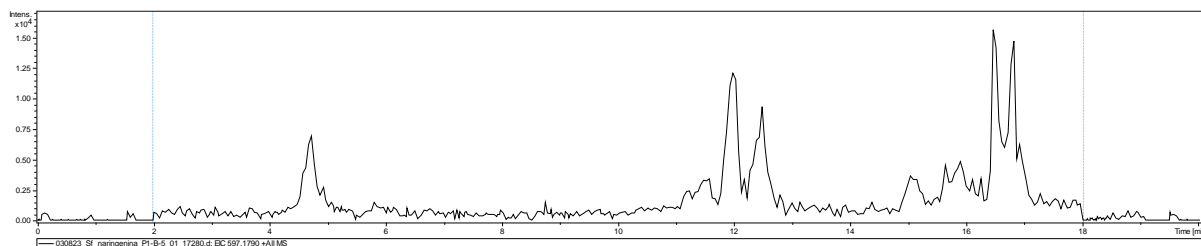


Os espectros de MS/MS (Figura A21) fornecem fragmentos característicos de compostos mono-glicosilados derivados de flavonoides. O íon precursor m/z 435.1286, ao perder uma unidade de glicose, resulta no fragmento correspondente à aglicona protonada, m/z 273.08. Vale ressaltar que nenhum dos fragmentos que mostrariam informações sobre a posição de substituição da hexose pôde ser observado, confirmando a necessidade de outros experimentos para que seja possível saber tal posição.

4.3.3.2 Derivado di-glicosilado de naringenina

A Figura 4.3.3.2.1 apresenta o pico cromatográfico do metabólito di-glicosilado observado em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentados com naringenina. O tempo de retenção ($t_R=4.7\text{min}$) desse composto deveria ser menor para estar dentro do esperado para derivados di-glicosilados, sendo menor que o t_R da aglicona naringenina e do derivado mono-glicosilado de naringenina.

Figura 4.3.3.2.1 Cromatograma de EIC para o derivado di-glicosilado de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina

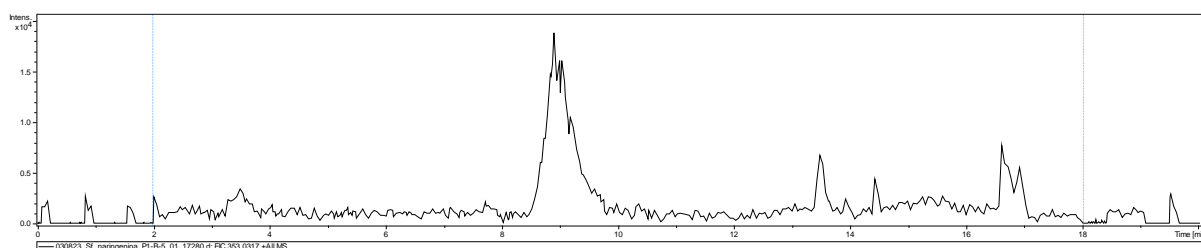


Os espectros de MS/MS (Figura A22) apresentam poucas informações a cerca das transições referentes as fragmentações do íon precursor m/z 597.1805. Porém, é possível observar a perda neutra de duas unidades de glicose (m/z 162.05, cada uma), resultando no fragmento m/z 273.07, referente à aglicona naringenina e o fragmento resultante da reação de Retro-Diels-Alder (RDA) no esqueleto da aglicona (m/z 153.02) (QIU et al., 2022). Não foi possível observar a presença da fragmentação referente a naringenina mono-glicosilada (m/z 435.13), mas de acordo com os fragmentos observados, sugeriu-se que todos os glicosídeos de naringenina são *O*-glicosilados.

4.3.3.3 Derivado sulfatado de naringenina

A Figura 4.3.3.3.1 apresenta o pico cromatográfico do metabólito sulfatado observado em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentados com naringenina. O tempo de retenção ($t_R=8.9\text{min}$) está dentro do esperado para derivados sulfatados, sendo menos polar que a aglicona naringenina e dos derivados glicosilados de naringenina.

Figura 4.3.3.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfatado de naringenina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina

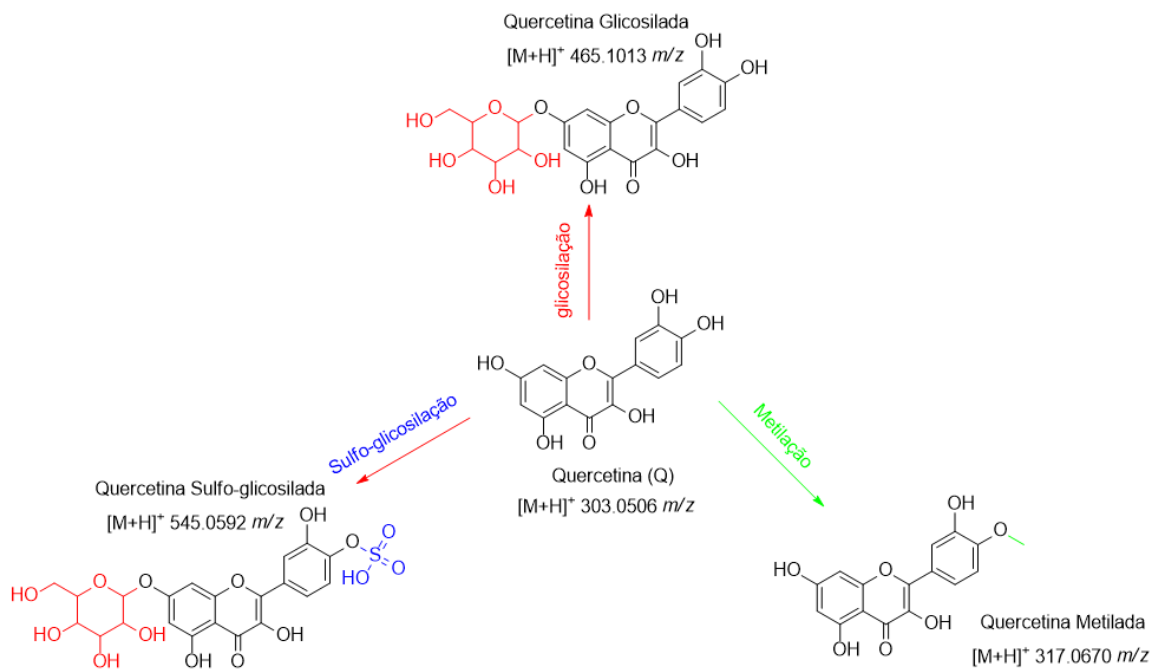


Os espectros de MS/MS (Figura A23) desse composto não apresentam a fragmentação referente a sua forma aglicona (m/z 273.07), porém é possível observar outros fragmentos clássicos referentes a flavonoides, como a fragmentação decorrente da RDA (m/z 153.02).

4.3.4 Derivados de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda*

Nos extratos de fezes de *S. frugiperda* alimentados com padrão de quercetina foram encontrados derivados mono-glicosilado, sulfo-glicosilado e alquilado oriundos da biotransformação metabólica (detoxificação). O Esquema 4.3.4.1 apresenta os metabólitos

encontrados nos extratos de fezes de *S. frugiperda*. As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.2.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.

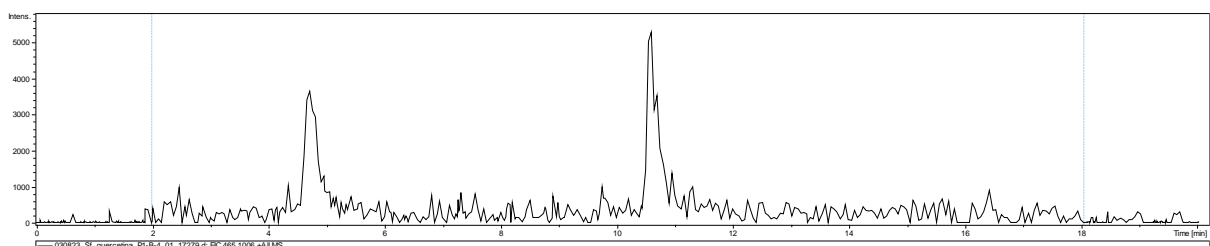


ESQUEMA 4.3.4.1 Estruturas representativas dos metabólitos de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina

4.3.4.1 Derivado glicosilado de quercetina

A Figura 4.3.4.1.1 apresenta o pico cromatográfico do metabólito mono-glicosilado observado em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentados com quercetina. O tempo de retenção ($t_R=4.7$ min) desse composto está dentro do esperado para derivados glicosilados, sendo menor que o t_R da aglicona quercetina.

Figura 4.3.4.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado mono-glicosilado de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina

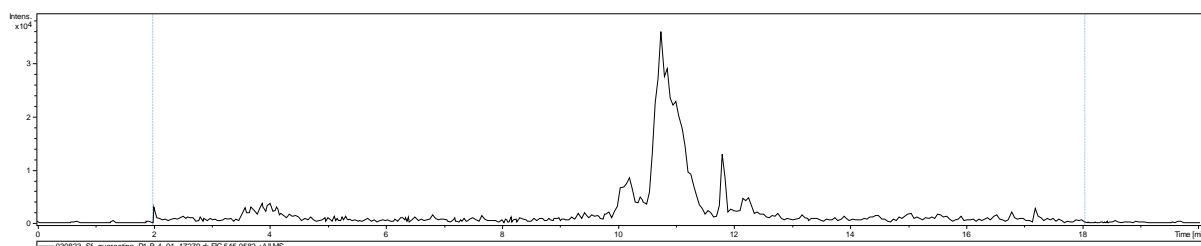


Os espectros de MS/MS (Figura A24) foram analisados e determinou-se, a partir do íon precursor m/z 465.1013, a perda de m/z 162.05 ($M+H-C_6H_{10}O_5$) para dar o íon fragmento m/z 303.05. Também foi possível observar a transição referente à fragmentação da RDA (m/z 153.02). Porém, não foi possível, apenas com as fragmentações observadas nos espectros de MS/MS, determinar a posição do açúcar na estrutura da quercetina. Sendo assim, ressalta-se a necessidade da realização de outros experimentos como a co-injeção com uma solução padrão de diferentes compostos de quercetina *O*-glicosilada ou a realização de experimentos de RMN para que seja possível determinar a posição de substituição do açúcar.

4.3.4.2 Derivado sulfo-glicosilado de quercetina

O derivado sulfo-glicosilado foi detectado no cromatograma no $t_R=4.02$, conforme ilustrado na Figura 4.3.4.2.1. Os espectros de MS/MS (Figura A25) apresentam as fragmentações relativas a derivados de flavonoides. Partindo do íon precursor m/z 545.0582, obtêm-se a fragmentação m/z 303.05, referente à perda neutra de uma glicose e do grupo fosfato. Isso indica que, possivelmente, a sulfatação desse composto ocorre no açúcar e não na aglicona quercetina, pois não foi possível observar a fragmentação referente à aglicona sulfatada. Também é possível que as energias de fragmentação utilizadas não tenham sido adequadas para permitir a observação do fragmento referente à aglicona sulfatada nos compostos que foram presumivelmente sulfatados na glicose.

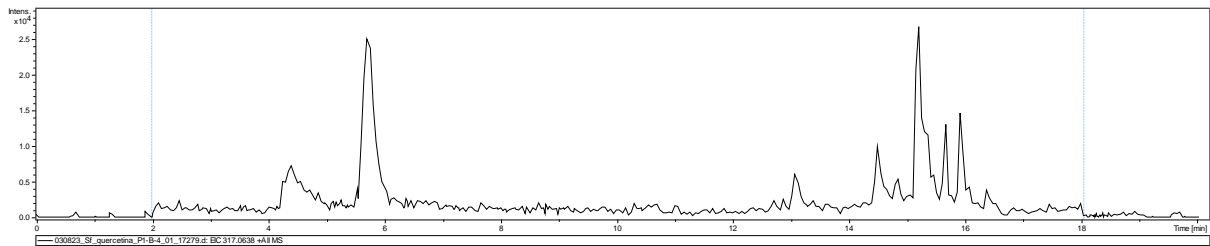
Figura 4.3.4.2.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfo-glicosilado de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina



4.3.4.3 Derivado alquilado de quercetina

O derivado metilado foi detectado no cromatograma no $t_R=13.12$, conforme ilustrado na Figura 4.3.4.3.1. Esse composto exibe um t_R superior ao da quercetina e aos derivados glicosilado e sulfo-glicosilado de quercetina, como seria de se esperar para esse tipo de modificação funcional.

Figura 4.3.4.3.1 Cromatograma de EIC para o derivado metilado de quercetina em extrato de fezes de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina



O espectro de MS/MS (Figura A26) apresenta o íon precursor m/z 317.0638, que dá origem a aglicona m/z 303.05 e ao íon fragmento m/z 153.02, referente a RDA (FABRE et al., 2001).

4.4 Anotação dos metabólitos encontrados em fezes de *Spodoptera cosmioides*

A rede molecular resultante das análises de espectrometria de massas (MS/MS) no modo positivo consistiu em 1644 íons precursores para o extrato de *S. cosmioides*, os quais foram apresentados como nodos (interligados ou único). A representação gráfica dessa rede pode ser encontrada na figura A27, presente no apêndice. Além disso, a plataforma GNPS conseguiu anotar um total de 42 substâncias, proporcionando uma abrangente visualização dos compostos presentes nos extratos dos respectivos compostos de tratamento. Vale ressaltar que, dentre esses compostos anotados pelo GNPS, apenas 5 substâncias foram consideradas como de interesse para a discussão dos resultados dessa subseção. Além disso, mais 5 substâncias, que não foram anotadas, foram consideradas como sendo derivados de compostos com núcleo flavânico. As anotações dos compostos foram organizadas de acordo com o composto administrado na dieta artificial de *S. cosmioides* e estão descritas na tabela 4.4.1.

Vale ressaltar que, apesar da análise cuidadosa dos dados obtidos nas anotações dos compostos, as atribuições ainda são anotações putativas e que, para uma caracterização inequívoca dos compostos, serão apresentadas análises adicionais que incluem propostas de fragmentação e comparações com alguns padrões.

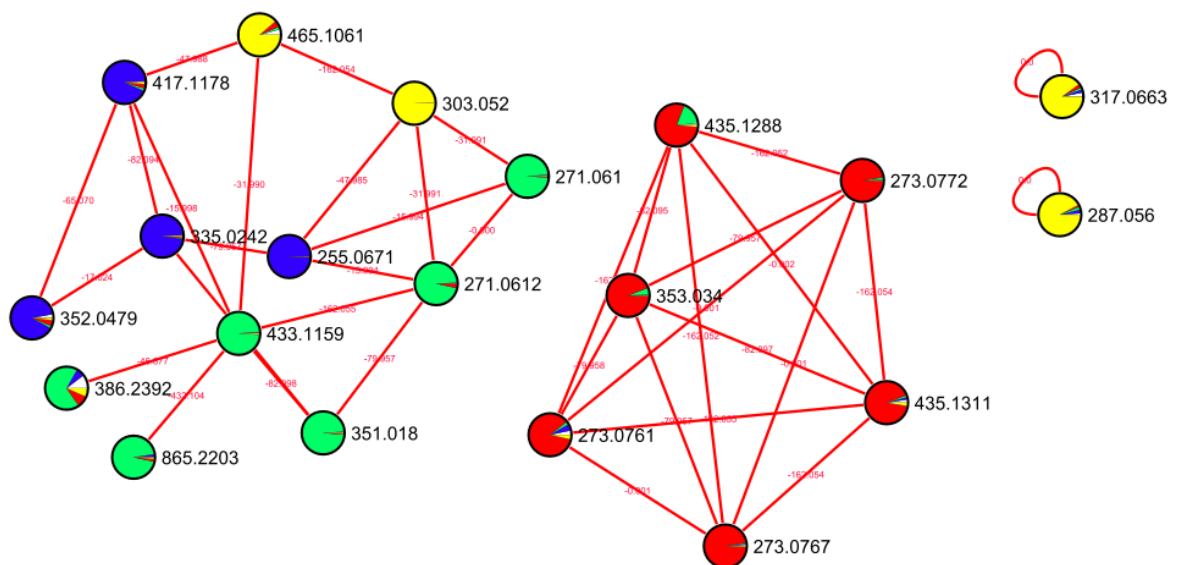
Tabela 4.4.1 Anotação putativa dos compostos encontrados em fezes de *S. cosmioides* utilizando a técnica de LC-MS/MS

N°	t _R (min)	Fórmula molecular	Íons característicos (m/z)			Anotação
			MS	Erro (ppm)	MS/MS	
Daidzeina - Cor azul						
1-Sc	2.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.1178 [M+H] ⁺	-0.50	255.06; 237.05; 227.07; 199.07; 145.03; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'- <i>O</i> - glicosilada
2-Sc	5.69	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ S	335.0242 [M+H] ⁺	2.77	255.06; 237.05; 227.07; 199.07; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'- <i>O</i> - sulfatada
Genisteina - Cor verde						
3-Sc	6.15	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1159 [M+H] ⁺	-6.93	271.06; 253.05; 243.07; 197.06; 215.07; 153.02	Genisteina <i>O</i> -glicosilada
4-Sc	9.12	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	351.0180 [M+H] ⁺	-2.71	271.06; 253.05; 243.06; 153.02	Genisteina <i>O</i> -sulfatada
Naringenina - Cor vermelha						
5-Sc	3.42	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.1311 [M+H] ⁺	-5.74	273.07; 171.03; 153.02	Naringenina <i>O</i> -glicosilada
6-Sc	6.51	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.1288 [M+H] ⁺	0.46	273.07; 171.03; 153.02	Naringenina <i>O</i> -glicosilada
7-Sc	8.95	C ₁₅ H ₁₂ O ₈ S	353.0340 [M+H] ⁺	3.96	153.02	Naringenina <i>O</i> -sulfatada
Quercetina - Cor amarela						
8-Sc	4.80	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1061 [M+H] ⁺	7.09	363.03; 303.05; 285.04; 257.04; 247.06; 229.05; 201.07; 183.05; 165.02; 153.02; 111.01	Quercetina <i>O</i> -glicosilada
9-Sc	12.84	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0560 [M+H] ⁺	3.48	257.05; 241.05; 229.06; 153.02	Quercetina reduzida

N°	t _R (min)	Fórmula molecular	Íons característicos (<i>m/z</i>)			Anotação
			MS	Erro (ppm)	MS/MS	
10	13.10	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.0663 [M+H] ⁺	2.21	153.02	Quercetina metilada

O *cluster* analisado (Figura 4.4.1) é constituído por 20 nodos, sendo que, dentre eles, apenas 10 nodos são representativos para os padrões administrados e seus respectivos derivados bioconvertidos pela espécie *S. cosmioides*. Vale ressaltar que os íons de m/z 386.2392 e 352.0479 foram encontrados em todos os extratos de fezes de *S. cosmioides*, sendo considerados possíveis interferentes. E o íon de m/z 865.2203 é um dímero de um derivado glicosilado de genisteína, sendo formado possivelmente na fonte de ionização do equipamento.

Figura 4.4.1 *Cluster* dos padrões e seus respectivos derivados biotransformados pela espécie *S. cosmioides* presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras de daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente.



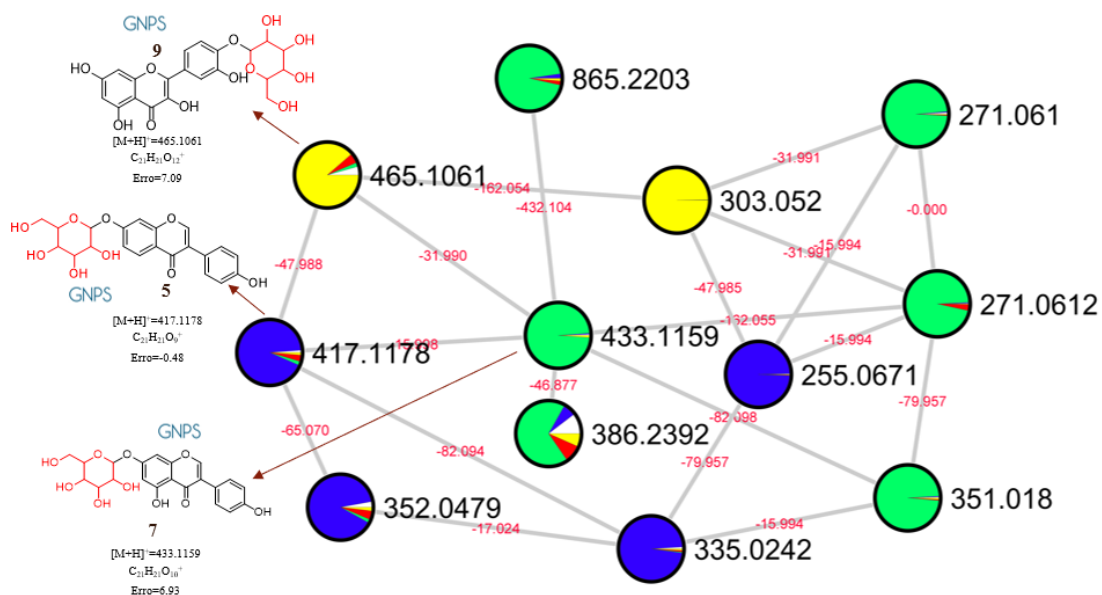
4.4.1 Anotação dos metabólitos glicosilados encontrados em fezes dos insetos de *S. cosmioides*

O *cluster* inicialmente analisado (*cluster* N9; Figura 4.4.1.1) é composto por 12 nodos, sendo 5 que representam derivados biotransformados de *S. cosmioides*. O íon m/z 417.1178 foi anotado como daidzeína 7-*O*-glicosídeo (daidzina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS está detalhada na Figura A27 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A28.

O íon m/z 433.1159 foi anotado como genisteína 7-*O*-glicosídeo (genistina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS está detalhada na Figura A29 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A30.

O íon m/z 465.1061 foi anotado como quercetina 4'-*O*-glicosídeo (espiraeósido). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS está detalhada na Figura A31 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A32.

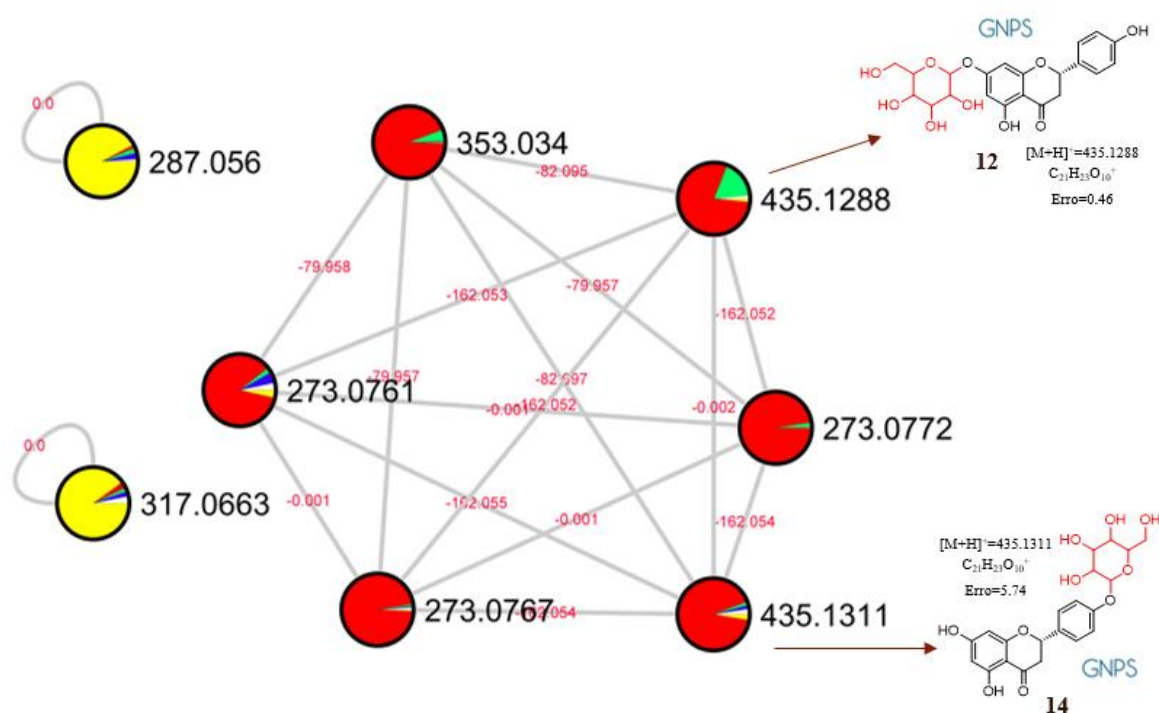
Figura 4.4.1.1 *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N9) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



Os íons m/z 435.13 (isômeros m/z 435.1311 e 435.1288) foram detectados em tempos de retenção diferentes, $t_R = 3.42$ e 6.51 min, respectivamente, sendo os dois pertencentes ao *cluster* N10 (Figura 4.4.1.2). Esses íons pertencem a um metabólito de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{10}$, que é um derivado de naringenina. A plataforma do GNPS anotou putativamente os dois isômeros, porém, sem conseguir fazer a distinção da posição da substituição do açúcar na molécula. Desta forma, foi observado a anotação para os dois isômeros como naringenina 7-*O*-glicosídeo (naringina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS, o

mirror match, está detalhada na Figura A33 e A34 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A35 e A36, respectivamente.

Figura 4.4.1.2 *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N10) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



Além da assistência da rede molecular na anotação dos compostos, a análise dos flavonoides glicosilados baseou-se principalmente na observação dos espectros de MS/MS dos íons e nas perdas neutras de 162.05 Da, que resultam na formação dos íons fragmentos da agliconas. Essas perdas indicam a presença de resíduo glicosil (Lyu et al., 2021; Yoshioka, 2021).

4.4.2 Anotação dos metabólitos sulfatados encontrados em fezes dos insetos de *S. cosmioides*

Analisando o *cluster* geral dos padrões (Figura 4.4.1), observamos a presença do íon de m/z 335.0242 no *cluster* N9 (Figura 4.4.1.1) pelo fato de, após a perda das unidades glicose (nos derivados glicosilados) e sulfato, apresentarem padrões de fragmentação semelhantes.

Contudo, esse íon não foi anotado pela plataforma GNPS e corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7S$ que é um derivado da daidzeína. A Figura 4.4.2.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro. Além disso, neste mesmo *cluster*, foi observada a presença do íon m/z 351.0180 que corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_8S$, que é um derivado de genisteína. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.4.2.2 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

Figura 4.4.2.1 *Cluster* N9 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 335.0242 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.

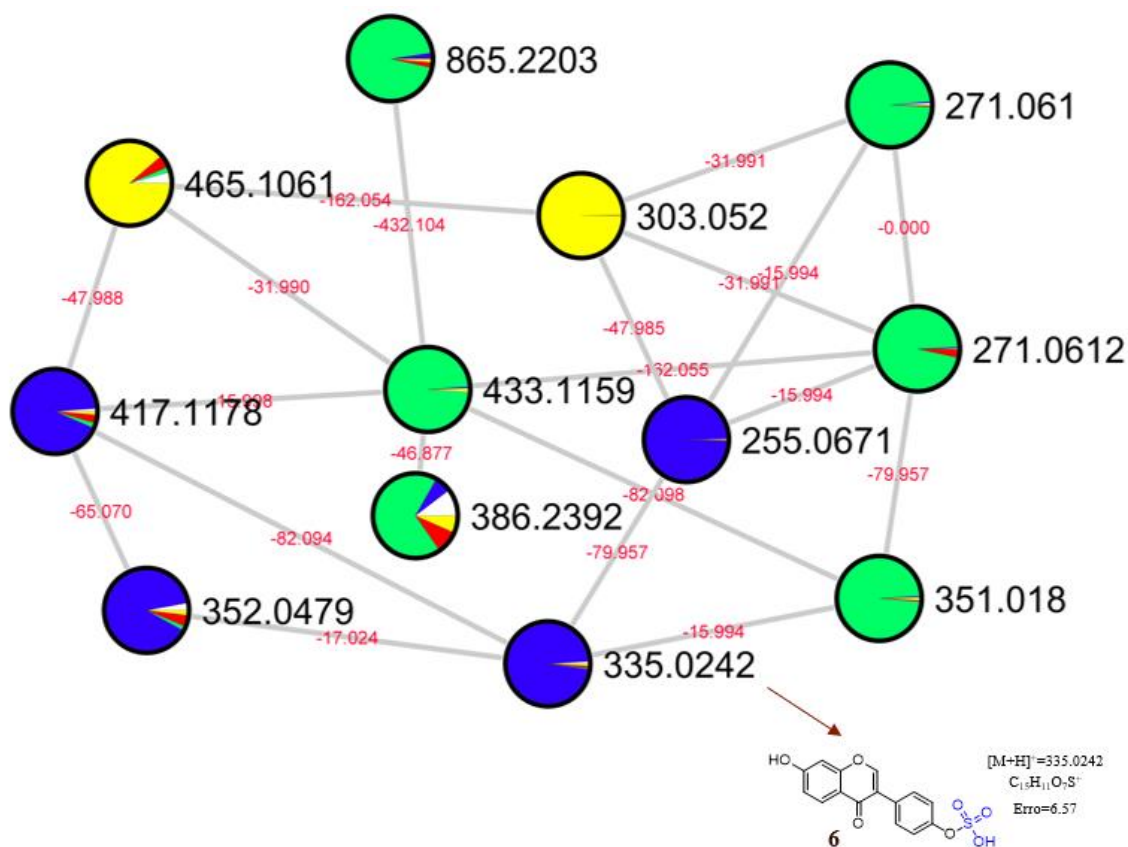
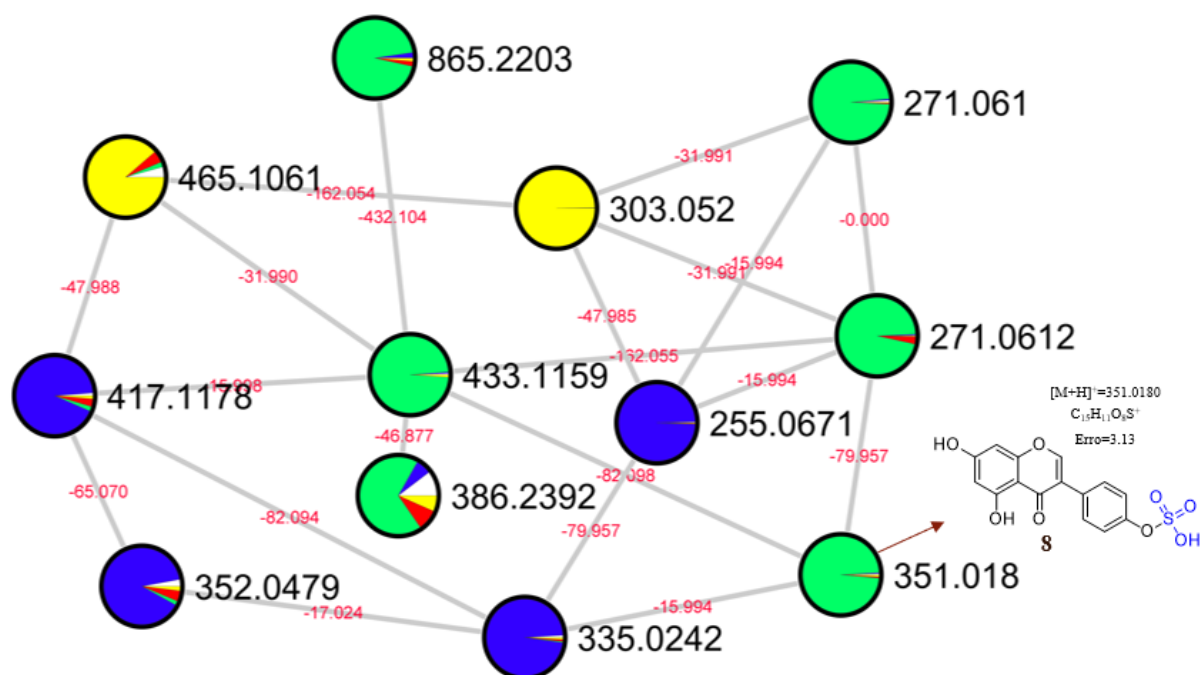


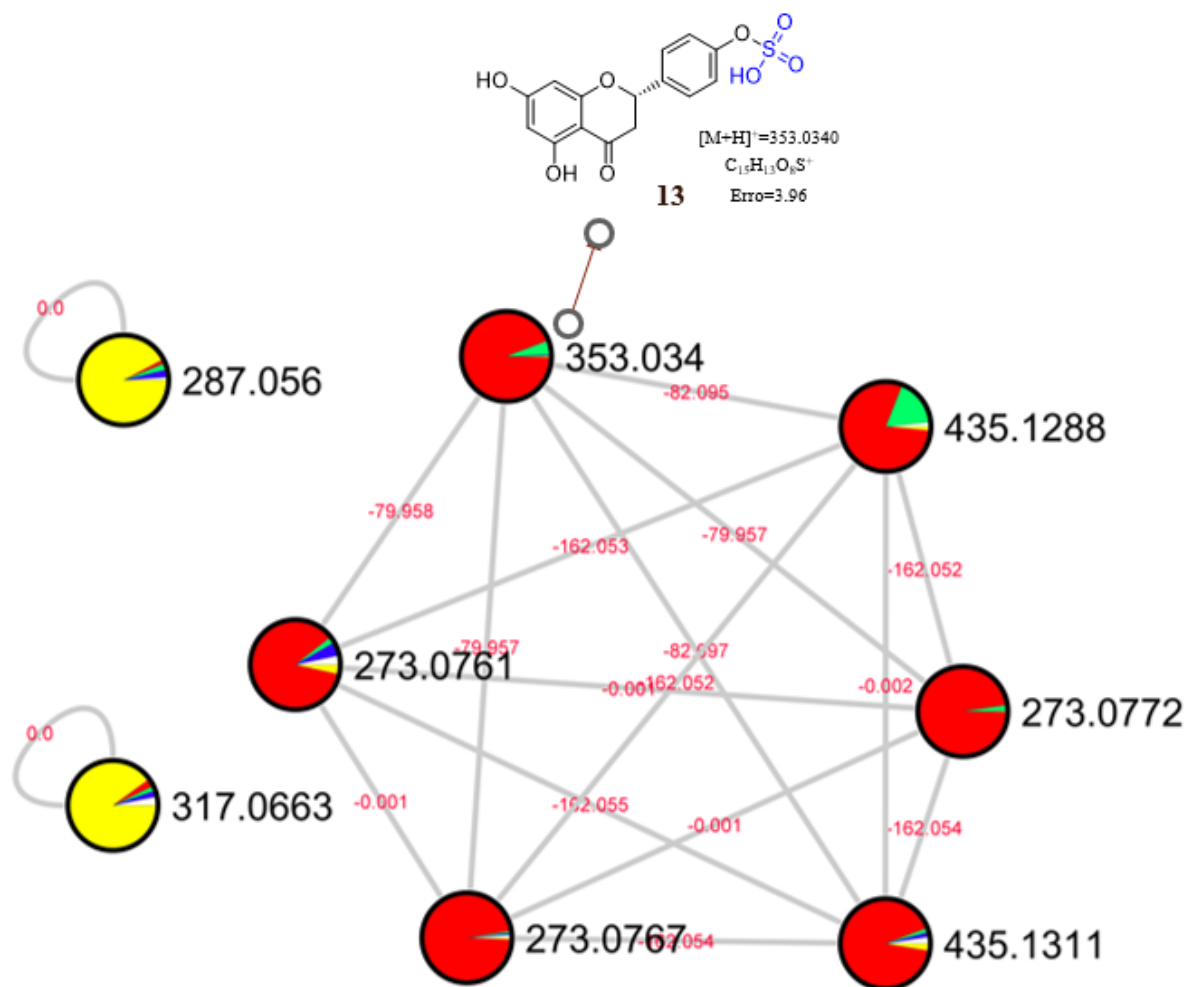
Figura 4.4.2.2 *Cluster* N9 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 351.0180 presente na rede molecular obtida a partir dos

dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



O íon m/z 353.0340 corresponde a um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_8S$, que é um derivado da naringenina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. Esse íon foi observado no *cluster* N10 (Figura 4.4.1.2). A Figura 4.4.2.3 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

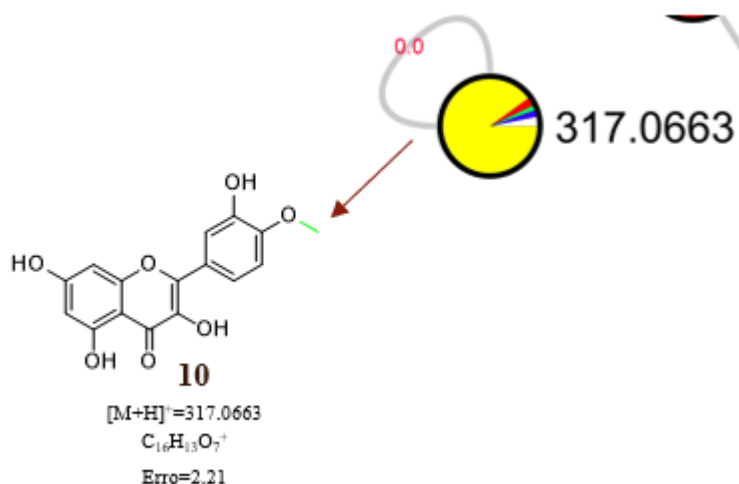
Figura 4.4.2.3 *Cluster* N10 apresentando a fórmula estrutural representativa, fórmula molecular e erro do íon de m/z 353.0340 presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.4.3 Anotação dos metabólitos alquilados encontrados em fezes dos insetos de *S. cosmioides*

Analisando o *cluster* de nodo único (*cluster* N11; Figura 4.4.3.1) é possível observar a presença do íon m/z 317.0663 como sendo um metabólito de fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$ que é um derivado de quercetina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.4.3.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

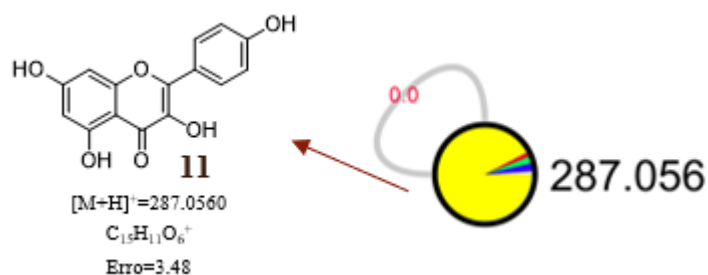
Figura 4.4.3.1 *Cluster* de nodo único (N11) formado pelo íon m/z 317.0663, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.4.4 Anotação dos metabólitos reduzidos encontrados em fezes dos insetos de *S. cosmioides*

Analisando o *cluster* de nodo único (*cluster* N12; Figura 4.4.4.1) é possível observar a presença do íon m/z 287.0560 como sendo um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ que é um derivado reduzido de quercetina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.4.4.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

Figura 4.4.4.1 *Cluster* de nodo único (N12) formado pelo íon m/z 287.0560, presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.5 Estudo dos padrões de fragmentação observados em derivados dos padrões de flavonoides administrados em dieta artificial

Nesta seção serão abordados e discutidos perfis de fragmentação de novos metabólitos derivados de flavonoides que não foram observados na espécie *S. frugiperda*. Desta forma, ao final da seção, é possível encontrar quais os metabólitos que não foram discutidos por terem padrões de fragmentação e comportamento cromatográfico semelhantes à espécie anterior.

4.5.1 Derivados de naringenina em extrato de fezes de *Spodoptera cosmioides*

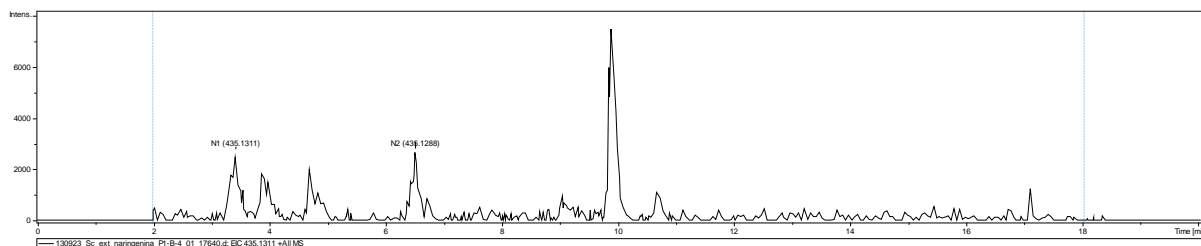
Nos extratos de fezes de *S. cosmioides* alimentados com padrão de naringenina foram encontrados derivados mono-glicosilados e sulfatado oriundos da biotransformação metabólica (detoxificação). Vale ressaltar que, para alguns metabólitos, não foi possível fazer a identificação exata, utilizando apenas cromatogramas e espectros de massa, das modificações na posição da estrutura da aglicona, sendo necessária a utilização de outras técnicas em trabalhos futuros. As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.4.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.

4.5.1.1 Derivados mono-glicosilados de naringenina

Os picos cromatográficos apresentados na figura 4.5.1.1 foram atribuídos a glicosídeos de naringenina devido à presença do íon de m/z 435.1311 ($t_R=3.42$) e 435.1288 ($t_R=6.51$) no espectro de EIC (Extracted Ion Chromatogram), que correspondem ao $[M+H]^+$ de isômeros de naringenina glicosilada, assim como, à presença da fragmentação 273.07, correspondente a aglicona naringenina, no espectro de MS/MS dos dois íons (Figura A35 e A36, respectivamente).

O perfil cromatográfico do extrato de naringenina para esses íons sugere que esses dois isômeros mono-glicosilados de naringenina, por terem tempos de retenção distantes um do outro, tenham as substituições dos açúcares em posições não equivalentes, modificando de forma significativa a polaridade da molécula. Ou seja, é possível que essas substituições estejam na posição 7 e 4' ou 5 e 4'.

Figura 4.3.4.3.1 Cromatograma de EIC para os derivados mono-glicosilados de naringenina em extrato de fezes de *S. cosmioides* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de naringenina



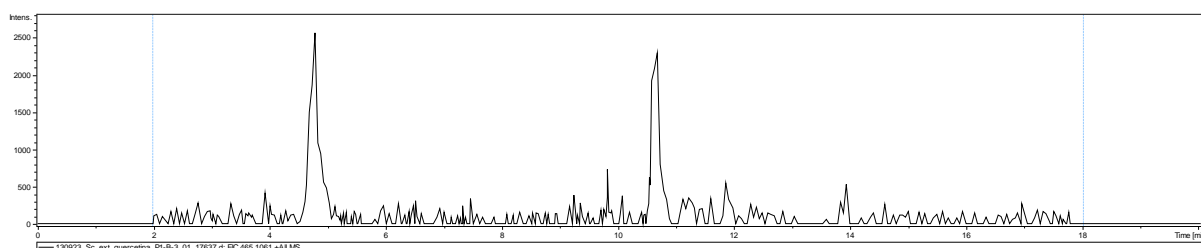
4.5.2 Derivados de quercetina em extrato de fezes de *S. cosmioides*

Nos extratos de fezes de *S. cosmioides* alimentados com padrão de quercetina foram encontrados derivados mono-glicosilado, reduzido e alquilado oriundos da biotransformação metabólica (detoxificação). Vale ressaltar que, para alguns metabólitos, não foi possível fazer a identificação exata, utilizando apenas cromatogramas e espectros de massa, das modificações na posição da estrutura da aglicona, sendo necessária a utilização de outras técnicas em trabalhos futuros. As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.4.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.

4.5.2.1 Derivado mono-glicosilado de quercetina

A Figura 4.5.2.1.1 apresenta o pico cromatográfico do metabólito mono-glicosilado observado em extrato de fezes de *S. cosmioides* alimentados com quercetina. O tempo de retenção ($t_R=4.80\text{min}$) desse composto está dentro do esperado para derivados glicosilados, sendo menor que o t_R da aglicona quercetina.

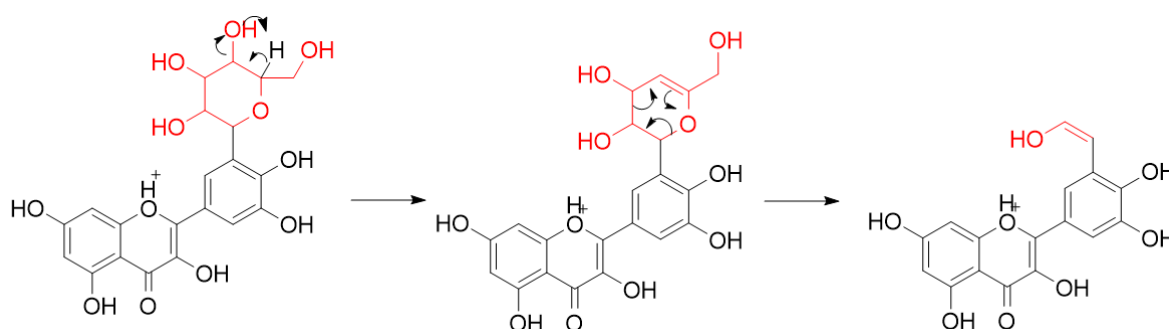
Figura 4.5.2.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado mono-glicosilado de quercetina em extrato de fezes de *S. cosmioides* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de quercetina



Os espectros de MS/MS (Figura A32) foram analisados e determinou-se, a partir do íon precursor m/z 465.1061, a perda de m/z 162.05 ($M+H-C_6H_{10}O_5$) para dar o íon fragmento m/z 303.05. Também foi possível observar a transição referente à fragmentação da RDA (m/z 153.02). Porém, não foi possível, apenas com as fragmentações observadas nos espectros de MS/MS, determinar a posição do açúcar na estrutura da quercetina. Foi possível observar também a transição para o íon fragmento m/z 363.03 que é a abertura do anel advindo da via do chiquimato (anel p-cumárico) após a perda neutra de uma unidade de água. Porém, essa

abertura só é possível acontecer após a perda de $[M+H-H_2O]$, fato que não foi observado no espectro de massa do íon m/z 465.11. Desta forma, é necessária a realização de novos experimentos para afirmar se a modificação na posição do açúcar é uma *O*- ou uma *C*-glicosilação. Na figura 4.5.2.1.2 observa-se a proposta de fragmentação com a abertura do anel do açúcar, o que sugeriria a modificação em um carbono da estrutura do flavonoide.

Figura 4.5.2.1.2 Proposta de fragmentação de um derivado *C*-glicosilado com a abertura parcial do anel do açúcar



4.5.2.2 Derivado reduzido de quercetina

O cromatograma referente ao derivado reduzido de quercetina está apresentado na Figura 4.5.2.2.1 e seus espectros de MS/MS estão na Figura A37. O tempo de retenção ($t_R=12.84$ min) desse composto está dentro do esperado, já que ao ser reduzida, a quercetina se assemelha a estrutura do kaempferol, sendo ainda uma aglicona. Porém, não é possível confirmar que a hidroxila reduzida da quercetina é a da posição 3'. Outros experimentos são necessários para que possa confirmar a posição de redução da hidroxila. Acredita-se que, com base nas fases do mecanismo de detoxificação para insetos herbívoros, alguma enzima redutora está envolvida na metabolização deste composto, porém, experimentos de biologia molecular são necessários para que possa determinar qual enzima está presente nesse processo.

Até onde se sabe, este é o primeiro trabalho envolvendo o estudo de mecanismos de detoxificação de insetos herbívoros que observou a presença de uma redução na estrutura da quercetina. O estudo aprofundado dessa classe de metabólitos se faz necessário, uma vez que, diversos estudos já determinaram a importância do aumento da polaridade da molécula em relação aos mecanismos de excreção de xenobióticos.

Os espectros de MS/MS revelam fragmentações referentes ao kaempferol e íons fragmentos identidades esperados para flavonoides (m/z 153.02).

Diante do exposto, os outros íons precursores listados na Tabela 4.4.1 e que não foram discutidos nessa seção, como os íons m/z 417.1178; 335.0242; 433.1159; 351.0180; 353.0340 e 317.0663 apresentam os mesmos perfis de fragmentação dos compostos observados anteriormente para a espécie *S. frugiperda*. Seus espectros de MS/MS podem ser observados nas Figuras A28; A37; A30; A38; A39 e A40, respectivamente.

4.6 Anotação dos metabólitos encontrados em fezes de *Spodoptera eridania*

A rede molecular resultante das análises de espectrometria de massas (MS/MS) no modo positivo consistiu em 728 íons precursores para o extrato de *S. eridania*, os quais foram apresentados como nodos (interligados ou único). A representação gráfica dessa rede pode ser encontrada na figura A42, presente no apêndice. Além disso, a plataforma GNPS conseguiu anotar um total de 29 substâncias, proporcionando uma abrangente visualização dos compostos presentes nos extratos dos respectivos compostos de tratamento. Vale ressaltar que, dentre esses compostos anotados pelo GNPS, apenas 1 substância foi considerada como de interesse para a discussão dos resultados dessa subseção. Além disso, mais 7 substâncias, que não foram anotadas, foram consideradas como sendo derivados de compostos com núcleo flavânico. As anotações dos compostos foram organizadas de acordo com o composto administrado na dieta artificial de *S. eridania* e estão descritas na tabela 4.6.1.

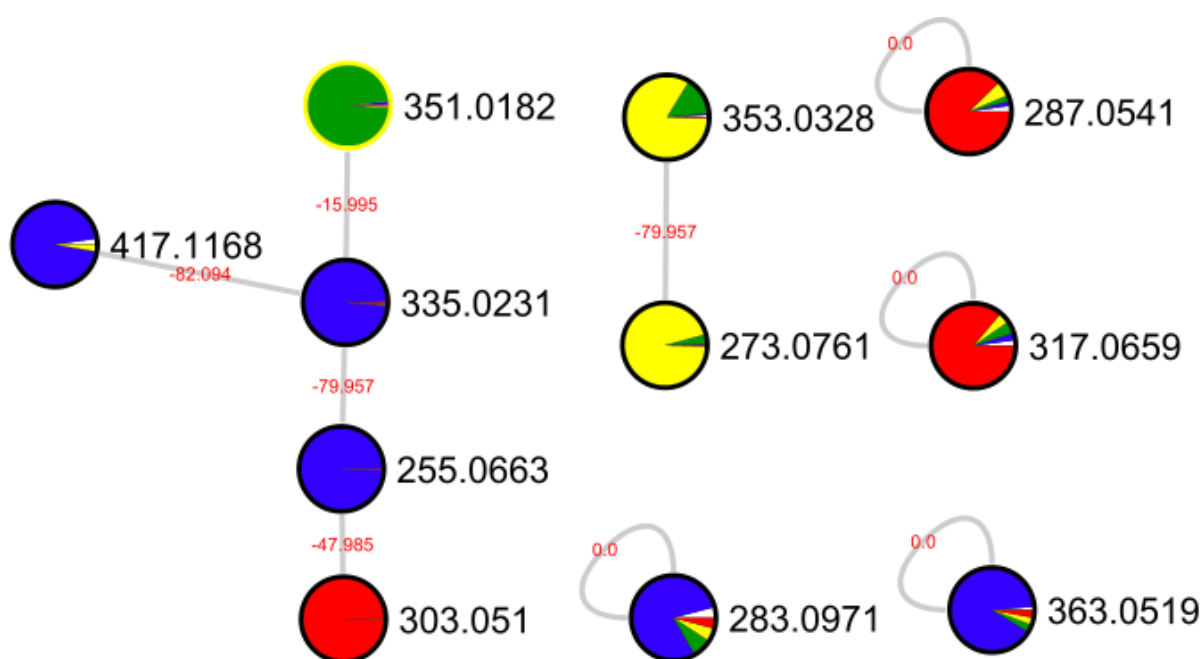
Vale ressaltar que, apesar da análise cuidadosa dos dados obtidos nas anotações dos compostos, as atribuições ainda são anotações putativas e que, para uma caracterização inequívoca dos compostos, serão apresentadas análises adicionais que incluem propostas de fragmentação e comparações com alguns padrões.

Tabela 4.6.1 Anotação putativa dos compostos encontrados em fezes de *S. eridania* utilizando a técnica de LC-MS/MS

N°	tr (min)	Fórmula molecular	Íons característicos (<i>m/z</i>)			Anotação
			MS	Erro (ppm)	MS/MS	
Daidzeina - Cor azul						
1-Se	2.32	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.1168 [M+H] ⁺	-2.88	255.06; 237.05; 227.07; 199.07; 145.03; 137.02	Daidzeina 7- <i>O</i> -glicosilada
2-Se	5.69	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ S	335.0231 [M+H] ⁺	3.28	255.06; 237.05; 227.07; 199.07; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'- <i>O</i> -sulfatada
3-Se	13.34	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ S	363.0519 [M+H] ⁺	-3.86	255.06; 237.05; 199.07; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'-sulfoetilada
4-Se	14.34	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	283.0971 [M+H] ⁺	2.12	255.06; 237.05; 199.07; 137.02	Daidzeina 7 ou 4'-etilada
Genisteina - Cor verde						
5-Se	8.88	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	351.0182 [M+H] ⁺	3.70	271.06; 253.05; 243.06; 153.02	Genisteina <i>O</i> -sulfatada
Naringenina - Cor vermelha						
6-Se	9.00	C ₁₅ H ₁₂ O ₈ S	353.0328 [M+H] ⁺	0.57	153.02	Naringenina <i>O</i> -sulfatada
Quercetina - Cor amarela						
7-Se	12.87	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0541 [M+H] ⁺	-3.13	257.05; 241.05; 229.06; 153.02	Quercetina reduzida
8-Se	13.12	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.0659 [M+H] ⁺	0.95	153.02	Quercetina metilada

O *cluster* analisado (Figura 4.6.1) é constituído por 11 nodos, sendo todos os nodos representativos para os padrões administrados e seus respectivos derivados bioconvertidos pela espécie *S. eridania*.

Figura 4.6.1 *Cluster* dos padrões e seus respectivos derivados biotransformados pela espécie *S. eridania* presente na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras de daidzeina, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente.

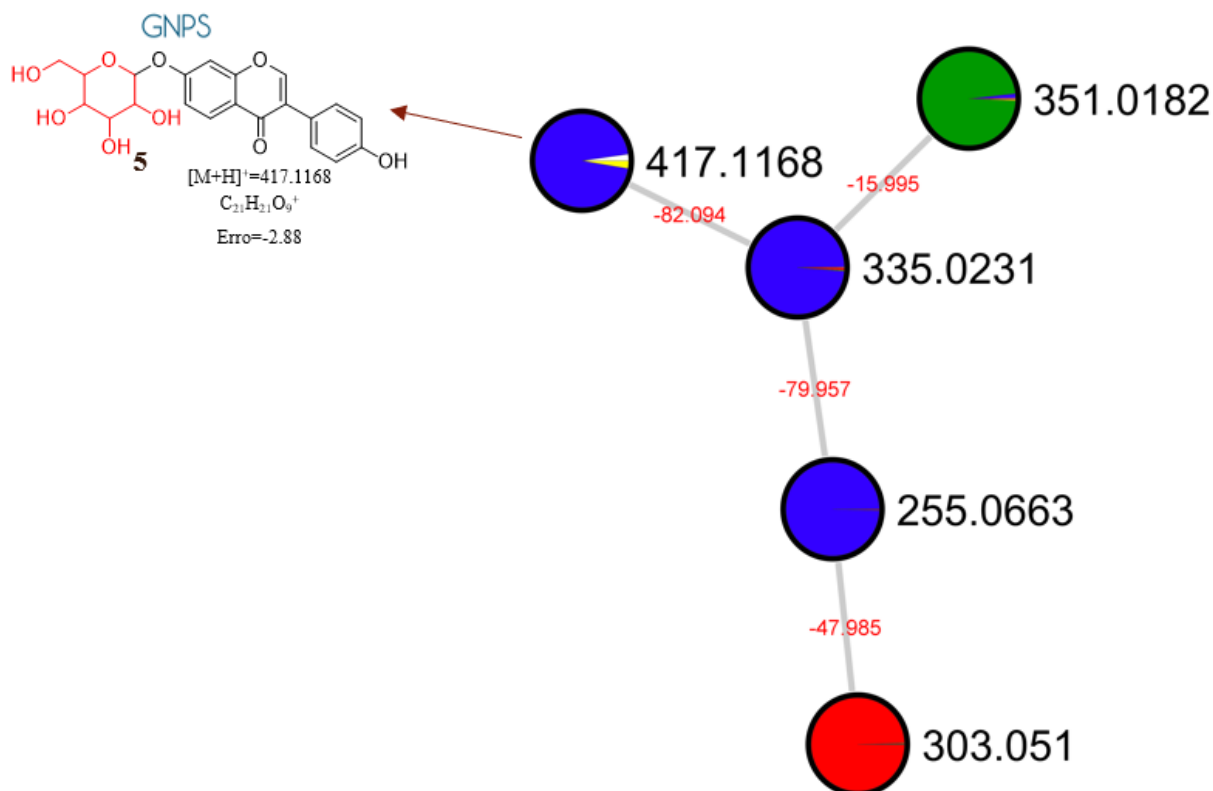


4.6.1 Anotação dos metabólitos glicosilados encontrados em fezes dos insetos de *S. eridania*

O *cluster* inicialmente analisado (*cluster* N13; Figura 4.6.1.1) é composto por 5 nodos, sendo todos representantes derivados biotransformados de *S. eridania*. O íon m/z 417.1168 foi anotado como daidzeína 7-*O*-glicosídeo (daidzina). A comparação espectral desse íon com a fornecida pelo GNPS está detalhada na Figura A43 e os espectros de MS/MS deste íon são mostrados na Figura A44.

Figura 4.6.1.1 *Cluster* dos flavonoides glicosilados (N13) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina,

respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



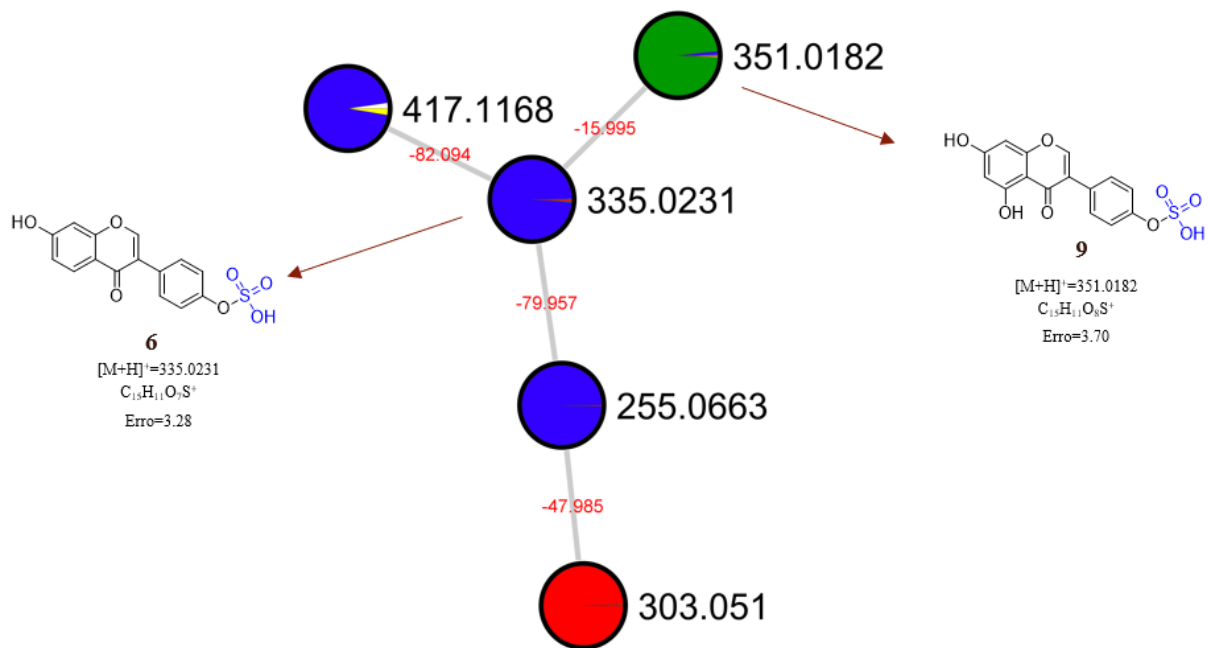
4.6.2 Anotação dos compostos sulfatados encontrados em fezes de insetos de *S. eridania*

Analisando o *cluster* N13 (Figura 4.6.1.1) é possível observar a presença de 2 nodos que são representativos de compostos sulfatados derivados de *S. eridania*. O íon m/z 335.0231 é um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7S$ que é um derivado de daidzeina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.6.2.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

O íon m/z 351.0182, observado no *cluster* N13 (Figura 4.6.1.1), é um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_8S$ que é um derivado de genisteina. No entanto, não foi possível ser anotado pela plataforma de GNPS. A Figura 4.6.2.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

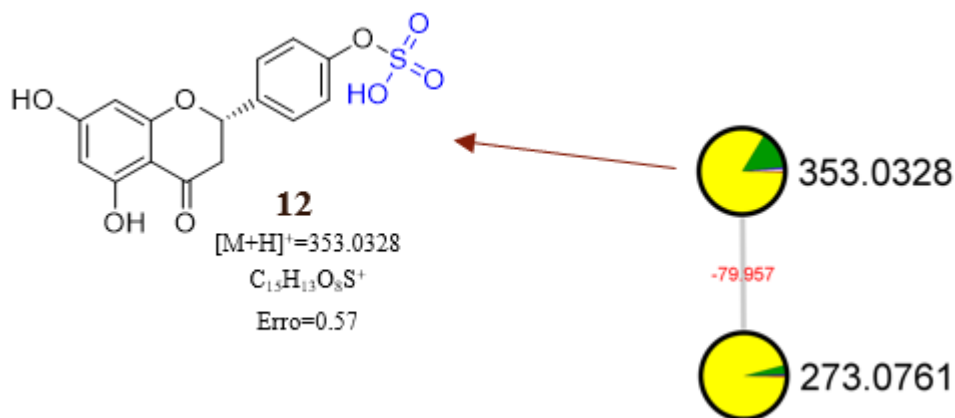
Figura 4.6.2.1 *Cluster* dos flavonoides sulfatados (N13) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina,

respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



Analisando o *cluster* N14 (Figura 4.6.2.2) é possível observar a presença do íon *m/z* 353.0328 como sendo um metabólito de fórmula molecular C₁₅H₁₂O₈S que é um derivado de naringenina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.6.2.2 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

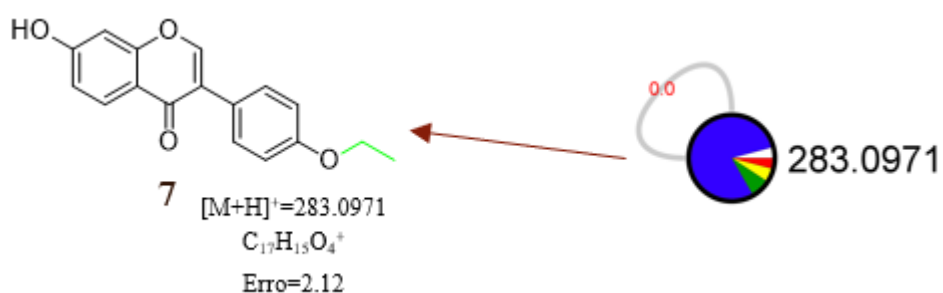
Figura 4.6.2.2 *Cluster* dos flavonoides sulfatados (N14) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.6.3 Anotação dos metabólitos alquilados encontrados em fezes dos insetos de *S. eridania*

Analisando o *cluster* de nodo único (*cluster* N15; Figura 4.6.3.1) é possível observar a presença do íon m/z 283.0971 como sendo um metabólito de fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_4$ que é um derivado de daidzeina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.6.3.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

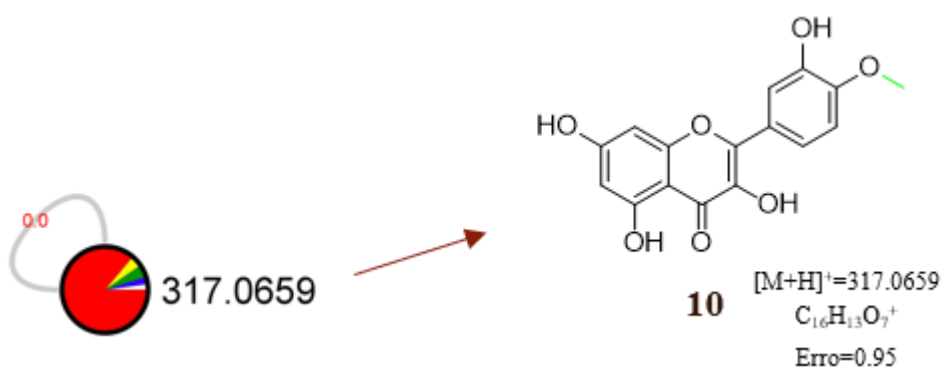
Figura 4.6.3.1 *Cluster* dos flavonoides etilados (N15) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeina, genisteina, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



Analisando o *cluster* de nodo único (*cluster* N16; Figura 4.6.3.2) é possível observar a presença do íon m/z 317.0659 como sendo um metabólito de fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_7$ que é um derivado de quercetina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura

4.6.3.2 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

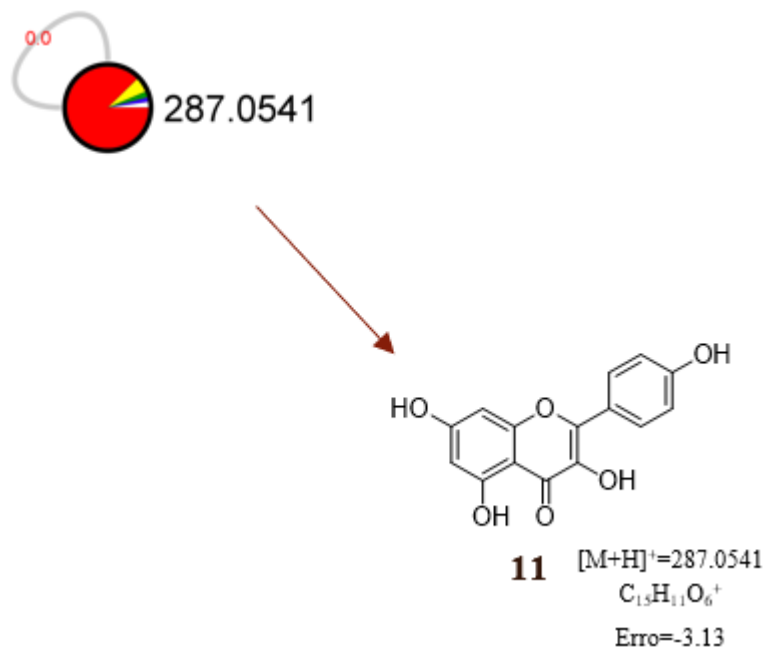
Figura 4.6.3.2 *Cluster* dos flavonoides metilados (N16) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.6.4 Anotação dos metabólitos reduzidos encontrados em fezes dos insetos de *S. eridania*

Analisando o *cluster* de nodo único (*cluster* N17; Figura 4.6.4.1) é possível observar a presença do íon m/z 287.0541 como sendo um metabólito de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$ que é um derivado reduzido de quercetina. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.6.4.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

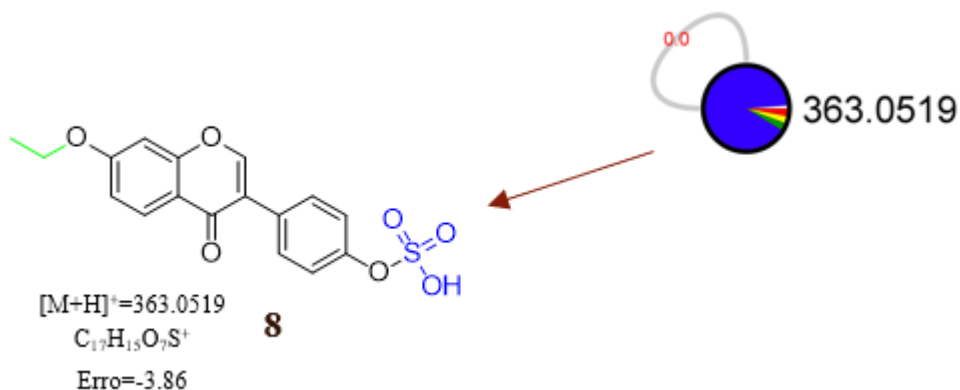
Figura 4.6.4.1 *Cluster* dos flavonoides reduzidos (N17) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.6.5 Anotação dos metabólitos sulfo-alquilados encontrados em fezes dos insetos de *S. eridania*

Formado por um nodo único, o *cluster* N18 (Figura 4.6.5.1) que compreende os metabólitos sulfo-alquilados apresentou um íon de m/z 363.0519 que corresponde a um metabólito de fórmula molecular C₁₇H₁₄O₇ que é derivado de daidzeína. No entanto, não foi anotado pela plataforma GNPS. A Figura 4.6.5.1 apresenta uma ilustração da fórmula estrutural juntamente com a respectiva fórmula molecular e o erro.

Figura 4.6.5.1 *Cluster* dos flavonoides sulfo-alquilados (N18) presentes na rede molecular obtida a partir dos dados adquiridos no modo positivo de ionização. O gráfico de pizza representa o nodo e indica a proporção em que o íon foi encontrado nas amostras analisadas. Tonalidades de azul, verde, vermelho e amarelo representam as amostras daidzeína, genisteína, naringenina e quercetina, respectivamente. Metabólitos anotados pelo GNPS estão acompanhados com o símbolo da plataforma.



4.7 Estudo dos padrões de fragmentação observados em derivados dos padrões de flavonoides administrados em dieta artificial

Nesta seção serão abordados e discutidos perfis de fragmentação de novos metabólitos derivados de flavonoides que não foram observados nas espécies *S. frugiperda* e *S. cosmioides*. Desta forma, ao final da seção, é possível encontrar quais os metabólitos que não foram discutidos por terem padrões de fragmentação e comportamento cromatográfico semelhantes à espécie anterior.

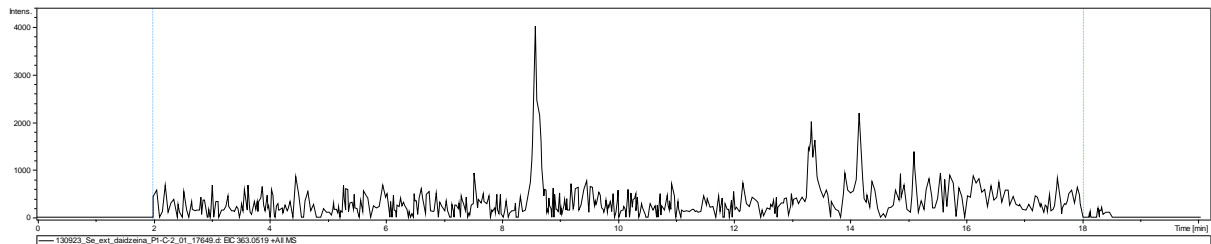
4.7.1 Derivados de daidzeina em extrato de fezes de *S. eridania*

Nos extratos de fezes de *S. eridania* alimentados com padrão de daidzeina foram encontrados derivados mono-glicosilado, alquilado e sulfo-alquilado oriundos da biotransformação metabólica (detoxificação). As massas exatas e os tempos de retenção (t_R) estão apresentados na Tabela 4.6.1, sendo ordenados em ordem decrescente de polaridade.

4.7.1.1 Derivado sulfo-alquilado de daidzeina

O derivado sulfo-alquilado foi detectado no cromatograma no $t_R=13.34$, conforme ilustrado na Figura 4.7.1.1.1. Os espectros de MS/MS (Figura A45) apresentam as fragmentações relativas a derivados de flavonoides. Partindo do íon precursor m/z 363.0519, obtêm-se a fragmentação m/z 255.06, referente à perda neutra de um grupo sulfato e do grupo alquilado. Isso indica que, possivelmente, a alquilação e a sulfatação desse composto estão ligados entre si e não na aglicona daidzeina em posições diferentes, pois não foi possível observar a fragmentação referente à aglicona sulfatada ou a aglicona alquilada, separadamente. Também é possível que as energias de fragmentação utilizadas não tenham sido adequadas para permitir a observação do fragmento referente à aglicona sulfatada e/ou alquilada nesse composto.

Figura 4.7.1.1.1 Cromatograma de EIC para o derivado sulfo-alquilado de daidzeina em extrato de fezes de *S. eridania* alimentadas com dieta artificial contendo padrão de daidzeina



Diante do exposto, os outros íons precursores listados na Tabela 4.6.1 e que não foram discutidos nessa seção, como os íons m/z 417.1168; 283.0971; 363.0519; 335.0231; 351.0182; 353.0328; 287.0541 e 317.0659 apresentam os mesmos perfis de fragmentação dos compostos observados anteriormente para as espécies *S. frugiperda* e *S. cosmioides*. Seus espectros de MS/MS podem ser observados nas Figuras A44; A46; A47; A48; A49; A50; A51 e A52, respectivamente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo realizado com espécies do gênero *Spodoptera* utilizando a plataforma *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) e a criação da rede molecular via *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) como ferramentas da metabolômica para anotações dos metabólitos secundários obtidos através dos extratos de fezes desses insetos. Os resultados sugerem que essas ferramentas podem ser potencialmente utilizadas para identificar moléculas oriundas da biotransformação metabólica resultantes dos mecanismos de detoxificação de insetos herbívoros.

A partir dos extratos obtidos, foi possível observar a presença de metabólitos secundários derivados do mecanismo de biotransformação desses insetos, sendo anotado um total de treze metabólitos derivados de compostos com núcleo flavânico. A baixa anotação relativa ao número total de compostos identificados neste trabalho pode ser explicada pelo fato da baixa quantidade de metabólitos presentes nesses extratos de fezes, sugerindo um preparo de amostra mais específico para cada classe de flavonoides.

Em resumo, esta dissertação explorou identificar os mecanismos de detoxificação de insetos herbívoros através de uma análise detalhada de perfis cromatográficos, espectros de massas e tratamento de dados a partir de ferramentas computacionais. Ao longo deste estudo, ficou claro que os mecanismos de biotransformação, para compostos com núcleo flavânico, é diferenciado entre as espécies do mesmo gênero. Ou seja, foi possível perceber que apenas *S. frugiperda* e *S. cosmioides* utilizam mecanismos de glicosilação para diminuir a toxicidade de todas as isoflavonas e flavonoides administrados na dieta, enquanto *S. eridania* foi capaz de glicosilar apenas a daidzeína. Todas as espécies desse trabalho conseguem metilar quercetina, provavelmente com o objetivo de reduzirem a capacidade dos flavonoides de gerarem espécies radicalares. Ainda assim, a observação de metilação apenas em quercetina sugere a importância das posições 3' e 4' para mecanismos de biotransformação dos flavonoides.

A menor quantidade de metabólitos biotransformados de *S. cosmioides* sugere uma capacidade reduzida de metabolizar agliconas, fato que pode estar relacionado a mesma não ser ainda uma praga primária. Apenas *S. frugiperda* não foi capaz de reduzir a aglicona quercetina, sugerindo que apenas as espécies *S. cosmioides* e *S. eridania* apresentam genes que codificam a síntese de enzimas com essa função, como por exemplo uma redutase. Não foi possível propor os sítios de biotransformações apenas com os experimentos de MS/MS. Sendo assim, se faz necessária a realização de outros experimentos com o objetivo de investigar os mecanismos de reações envolvidos no metabolismo dessas lagartas. Ainda

assim, será possível sugerir as posições que as enzimas atuam em flavonoides e isoflavonas, revelando a especificidade ou não por determinados sítios de modificação. Os dados obtidos sobre as capacidades de biotransformação das diferentes espécies são qualitativos. Pode ser que diferentes espécies expressem os genes de detoxificação em diferentes níveis, e com diferentes dinâmicas de indução, e a "tolerância global" do inseto dependa do controle de diferentes rotas. Uma análise mais rigorosa do efeito de cada rota na capacidade de detoxificação dos insetos deverá incluir estudos qualitativos dos metabólitos excretados (possivelmente usando marcação com isótopos) e/ou qPCR para comparar a expressão dos diferentes genes.

Essas descobertas têm implicações significativas para a química de produtos naturais e ecologia química, como discutido nas seções anteriores. Isso abre novas perspectivas para futuras investigações, especialmente no que diz respeito ao estudo das interações planta-inseto.

Em última análise, esta dissertação destaca a complexidade e a importância do estudo dos mecanismos de detoxificação de insetos herbívoros e a utilização de ferramentas computacionais para auxiliar as abordagens metabólicas com LC-MS/MS *target* e *untarget*, e enfatiza a necessidade contínua de investigação e desenvolvimento neste campo. Espero que este estudo estimule discussões futuras e inspire esforços adicionais para abordar a ecologia química de maneira inovadora.

REFERÊNCIAS

- AHN, S.-J.; BADENES-PÉREZ, F. R.; REICHELT, M.; SVATOŁ, A.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; HECKEL, D. G. Metabolic detoxification of capsaicin by UDP-glycosyltransferase in three *Helicoverpa* species. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 104-118, 26 ago. 2011. Wiley.
- AHN, S.-J.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 133-147, fev. 2012. Elsevier BV.
- AMEZIAN, D.; NAUEN, R.; GOFF, G. Le. Comparative analysis of the detoxification gene inventory of four major Spodoptera pest species in response to xenobiotics. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 138, n. 0, p. 103646-0, nov. 2021.
- BERENBAUM, M. R. POSTGENOMIC CHEMICAL ECOLOGY: FROM GENETIC CODE TO ECOLOGICAL INTERACTIONS. *J. Chem. Ecol.* 28, 873–895, 2002.
- BERNAYS, E.A., HOWARD, J.J., Champagne, D., Estes, B.J. RUTIN: A PHAGOSTIMULANT FOR THE GRASSHOPPER *Schistocerca americana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 60, 19-28. 1991.
- BLANEY, M.W., SIMMONDS M.S.J. ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTIVITY IN INSECTS IN RESPONSE TO ANTIFEEDANTS. COPR report Project 9; Overseas Development Organisation, London, UK, pp. 219. 1983.
- BOZZOLAN, F., SIAUSSAT, D., MARIA, A., DURAND, N., POTTIER, M.A., CHERTEMPS, T., MAÏBECHÉ-COISNE, M. ANTENNAL URIDINE DIPHOSPHATE (UDP)-GLYCOSYL-TRANSFERASES IN A PEST INSECT: DIVERSITY AND PUTATIVE FUNCTION IN ODORANT AND XENOBIOTICS CLEARANCE. *Insect Mol. Biol.* 23, 539-549. 2014.
- BRYANT, J. P., CHAPIN, F. S., KLEIN, D. R. CARBON NUTRIENT BALANCE OF BOREAL PLANTS IN RELATION TO VERTEBRATE HERBIVORY. *Oikos* 40: 357–368. 1983.
- CHEN, M. INDUCIBLE DIRECT PLANT DEFENSE AGAINST INSECT HERBIVORES: A REVIEW. *Insect Science* 15: 101–114. 2008.
- DAIMON, T., HIRAYAMA, C., KANAI, M., RUIKE, Y., MENG, Y., KOSEGAWA, E., NAKAMURA, M., TSUJIMOTO, G., KATSUMA, S., SHIMADA, T. THE SILKWORM GREEN B LOCUS ENCODES A QUERCETIN 5-O-GLUCOSYLTRANSFERASE THAT PRODUCES GREEN COCOONS WITH UV-SHIELDING PROPERTIES. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11471-11476. 2010.
- DAVIES, L.; WILLIAMS, D. R.; AGUIAR-SANTANA, I. A.; PEDERSEN, J.; TURNER, P. C.; REES, H. H. Expression and down-regulation of cytochrome P450 genes of the CYP4 family by ecdysteroid agonists in *Spodoptera littoralis* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 36, n. 10, p. 801-807, out. 2006. Elsevier BV.
- Della Negra B L. (2019). *METABOLISMO DE FLAVONOIDES POR Spodoptera frugiperda E Anticarsia gemmatilis*.

- Demarque, D. P., Crotti, A. E. M., Vessecchi, R., Lopes, J. L. C., & Lopes, N. P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. In *Natural Product Reports* (Vol. 33, Issue 3, pp. 432–455). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5np00073d>
- DESPRÉS, L.; DAVID, Jean-Philippe; GALLET, C. THE EVOLUTIONARY ECOLOGY OF INSECT RESISTANCE TO PLANT CHEMICALS. *Trends In Ecology & Evolution*, França, v. 22, n. 6, p. 327-338, jul. 2007.
- Franco D C. (2021). *METABOLISMO DE DAIDZEINA E GENISTEINA POR Spodoptera frugiperda*.
- FRANZIN, Mayara Loss; BOTTI, Jessica Mayara Coffler; FADINI, Marcos Antonio Matiello; MELO, Júlio Onésio Ferreira; MENDES, Simone Martins. MULTIPLE INFESTATIONS INDUCE DIRECT DEFENSE OF MAIZE TO *Tetranychus urticae* (Acari: tetranychidae). *Florida Entomologist*, [S.L.], v. 103, n. 3, 2020. Florida Entomological Society.
- GORDY J.W., LEONARD B.R., BLOUIN D., DAVIS J.A., STOUT M.J. Comparative Effectiveness of potential elicitors of plant resistance against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: noctuidae) in four crop plants. *PLoS One*, 10, 2015.
- GRAHAM, L.T. FLAVONOID AND ISOFLAVONOID DISTRIBUTION IN DEVELOPING SOYBEAN SEEDLING TISSUES AND IN SEED ROOT EXUDATES. *Plant. Physiol*, 95, 594-603. 1991.
- HARBORNE, J.B., TURNER, L. PLANT CHEMOSYSTEMATICS. Academic Press, London, pp. 562. 1984.
- HECKEL, D.G. INSECT DETOXIFICATION AND SEQUESTRATION STRATEGIES. *Ann. Plant Rev.* 47, 77-114. 2014.
- HEIDEL-FISCHER, H.M., VOGEL, H. MOLECULAR MECHANISMS OF INSECT ADAPTATION TO PLANT SECONDARY COMPOUNDS. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 8-14. 2015.
- HERMS, D. A, MATTSON, W. J. THE DILEMMA OF PLANTS: TO GROW OR DEFEND. *Quarterly Review of Biology* 67: 283–335. 1992.
- HOFFMANN-CAMPO C. B. ROLE OF THE FLAVONOIDS IN THE NATURAL RESISTANCE OF SOYBEAN TO *Heliothis virescens* (F.) AND *Trichoplusia ni* (HUBNER). Ph.D. Dissertation. The University of Reading. 1995.
- Hong, J. L., Qin, X. Y., Shu, P., Wang, Q., Zhou, Z. F., Wang, G. K., Lin, B. Bin, Wang, Q., & Qin, M. J. (2011). Comparative study of isoflavones in wild and cultivated soybeans as well as bean products by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and chemometric techniques. *European Food Research and Technology*, 233(5), 869–880. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1564-z>
- HOPKINS, T.L., KRAMER, K.J. INSECT CUTICLE SCLEROTIZATION. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 273-302. 1992.

- HUANG F., QURESHI J. A., MEAGHER JR, R. L., REISIG D. D., HEAD G. P., ANDOW D. A., NI X., KERNS D., BUNTIN G. D., NIU Y., YANG F., DANGAL V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided Bt maize. *PLoS ONE*, 9, e112958. 2014.
- ISRANI, B. et al. The Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* Utilizes Specific UDP-Glycosyltransferases to Inactivate Maize Defensive Benzoxazinoids. *Frontiers In Physiology*, [S.L.], v. 11, 21 dez. 2020.
- Jeschke, V., Gershenzon, J., & Vassão, D. G. (2016). 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.02.002>
- KANT, M. R.; JONCKHEERE, W.; KNEGT, B.; LEMOS, F.; LIU, J.; SCHIMMEL, B. C. J.; VILLARROEL, C. A.; ATAIDE, L. M. S.; DERMAUW, W.; GLAS, J. J.. MECHANISMS AND ECOLOGICAL CONSEQUENCES OF PLANT DEFENCE INDUCTION AND SUPPRESSION IN HERBIVORE COMMUNITIES. *Annals Of Botany*, [S.L.], v. 115, n. 7, p. 1015-1051, 27 maio 2015. Oxford University Press (OUP).
- KHEDR M.A.,AL-SHANNAF H.M.,MEAD H.M.,SHAKER S.A.E.A.. Comparative study to determine food consumption of cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, on some cotton genotypes. *J. Plant Protect. Res.*, 55 (3), pp. 312-321. 2015
- KOGAN, M.; FISHER, D. C. INDUCIBLE DEFENSES IN SOYABEAN AGAINST HERBIVOROUS INSECTS, pp. 347-380, in W. D. Tallamy and M. J. Raupp (eds.). *Phytochemical Induction by Herbivorous*. John Wiley & Sons, New York, 1991.
- KOJIMA, W., FUJII, T., SUWA, M., MIYAZAWA, M., ISHIKAWA, Y. PHYSIOLOGICAL ADAPTATION OF THE ASIAN CORN BORER *Ostrinia furnacalis* TO CHEMICAL DEFENSES OF ITS HOST PLANT, MAIZE. *J. Insect Physiol.* 56, 1349-1355. 2010.
- KRAMER, K.J., HOPKINS, T.L. TYROSINE METABOLISM FOR INSECT CUTICLE TANNING. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6, 279-301. 1987.
- KREMPL, C.; SPORER, T.; REICHEL, M.; AHN, S.-J.; HEIDEL-FISCHER, H.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G.; JOUBEN, N.. Potential detoxification of gossypol by UDP-glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 71, p. 49-57, abr. 2016.
- LANG, D.R., RACKER, E. EFFECTS OF QUERCETIN AND F1 INHIBITOR ON MITOCHONDRIAL ATPASE AND ENERGY-LINKED REACTIONS IN SUBMITOCHONDRIAL PARTICLES. *Biochemical Biophysical Acta* 333, 180-186. 1974.
- Lyu, Q., Wen, X., Liu, Y., Sun, C., Chen, K., Hsu, C. C., & Li, X. (2021). Comprehensive Profiling of Phenolic Compounds in White and Red Chinese Bayberries (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) and Their Developmental Variations Using Tandem Mass Spectral Molecular Networking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(2), 741–749. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04117>

- MAAGD, R. A, BOSCH, D, Stiekema, W. *Bacillus thuringiensis* TOXIN-MEDIATED INSECT RESISTANCE IN PLANTS. Trends in Plant Science 4: 9–13. 1999.
- MELLO, M. O, SILVA FILHO, M. C. INTERAÇÕES PLANTA-INSETO: UMA CORRIDA ARMAMENTISTA EVOLUTIVA ENTRE DOIS MECANISMOS DE DEFESA DISTINTOS. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 14: 71–81. 2002.
- MITCHELL, M.J., KEOGH, D.P., CROOKS, J.R., SMITH, S.L. EFFECTS OF PLANT FLAVONOIDS ON INSECT CYTOCHROME P-450 DEPENDENT STEROID HYDROXYLASE ACTIVITY. Insect Biochemical and Molecular Biology 23, 65-71. 1993.
- MITHÖFER, Axel; BOLAND, Wilhelm. PLANT DEFENSE AGAINST HERBIVORES: CHEMICAL ASPECTS. Annual Review Of Plant Biology, v. 63, n. 1, p. 431-450, jun. 2012. Annual Reviews.
- Negra B L D. (n.d.). “*METABOLISMO DE FLAVONOIDES POR Spodoptera frugiperda E Anticarsia gemmatilis.*”
- PINTO-ZEVALLOS, Delia M.; MARTINS, Camila B. C.; PELLEGRINO, Ana C.; ZARBIN, Paulo H. G. COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS NA DEFESA INDUZIDA DAS PLANTAS CONTRA INSETOS HERBÍVOROS. Química Nova, Curitiba, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.
- Piubelli, G. C., Hoffmann-Campo, C. B., Moscardi, F., Miyakubo, S. H., & Neves De Oliveira, M. C. (2005). Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*? *Journal of Chemical Ecology*, 31(7), 1509–1525. <https://doi.org/10.1007/S10886-005-5794-Z/TABLES/3>
- PIUBELLI, Giorla Carla; HOFFMANN-CAMPO, Clara Beatriz; MOSCARDI, Flávio; MIYAKUBO, Sandra Hitomi; OLIVEIRA, Maria Cristina Neves de. ARE CHEMICAL COMPOUNDS IMPORTANT FOR SOYBEAN RESISTANCE TO *Anticarsia gemmatilis*? *Journal Of Chemical Ecology*. Paraná, p. 1-17. jul. 2005.
- POTTIER, M.-A.; BOZZOLAN, F.; CHERTEMPS, T.; JACQUIN-JOLY, E.; LALOUETTE, L.; SIAUSSAT, D.; MAÏBÈCHE-COISNE, M.. Cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in the olfactory organ of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology*, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 568-580, 18 set. 2012.
- Qiu, Z. C., Zhang, F. X., Hu, X. L., Zhang, Y. Y., Tang, Z. L., Zhang, J., Yang, L., Wong, M. S., Chen, J. X., & Xiao, H. H. (2022). Genistein Modified with 8-Prenyl Group Suppresses Osteoclast Activity Directly via Its Prototype but Not Metabolite by Gut Microbiota. *Molecules*, 27(22). <https://doi.org/10.3390/molecules27227811>
- SIMMONDS, Monique S.J. IMPORTANCE OF FLAVONOIDS IN INSECT–PLANT INTERACTIONS: FEEDING AND OVIPOSITION. *Phytochemistry*, v. 56, n. 3, p. 245-252, fev. 2001.
- Souza, A. L. C. de. (n.d.). *Estudo metabolômico de espécies de Picramnia e reavaliação da classificação morfológica do gênero. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2023. Dissertação de mestrado, 146 p.*

- SOUZA, Bruno Henrique Sardinha de. FATORES E MECANISMOS QUE INFLUENCIAM A RESISTÊNCIA EM SOJA A *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER E *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH). 2014. 164 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Jaboticabal, 2014. Cap. 5.
- STAMP, N. OUT OF THE QUAGMIRE OF PLANT DEFENSE HYPOTHESES. *Quarterly Review of Biology*, 78: 23–55. 2003.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., Van Der Voort, M., Pogliano, K., Gross, H., Raaijmakers, J. M., Moore, B. S., Laskin, J., Bandeira, N., & Dorrestein, P. C. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1203689109>
- WOUTERS, F.C., REICHEL, M., GLAUSER, G., BAUER, E., ERB, M., GERSHENZON, J., VASSAO, D.G., 2014. Reglucosylation of the benzoxazinoid dimboa with inversion of stereo chemical configuration is a detoxification strategy in lepidopteran herbivores. *Angew. Chem.* 53, 11320-11324.
- WU, J, BALDWIN, I. T. HERBIVORY-INDUCED SIGNALLING IN PLANTS: PERCEPTION AND ACTION. *Plant, Cell and Environment* 32: 1161–1174. 2009.
- Yoshioka, J. M. (n.d.). “*INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS DA AROEIRA-PRETA Myracrodruon urundeuva Freire Allemão NO DESENVOLVIMENTO DAS SEMENTES DAS BRAQUIÁRIAS Urochloa decumbens Stapf E Urochloa brizantha (Hochst. ex A. Rich) Stapf.*”
- ZANGERL, A. R, RUTLEDGE, C. E. THE PROBABILITY OF ATTACK AND PATTERNS OF CONSTITUTIVE AND INDUCED DEFENSE: A TEST OF OPTIMAL DEFENSE THEORY. *American Naturalist* 147: 599–608. 1996.
- Zhou, Y. Y., Luo, S. H., Yi, T. S., Li, C. H., Luo, Q., Hua, J., Liu, Y., & Li, S. H. (2011). Secondary metabolites from Glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6004–6010. <https://doi.org/10.1021/jf200821p>

APÊNDICE

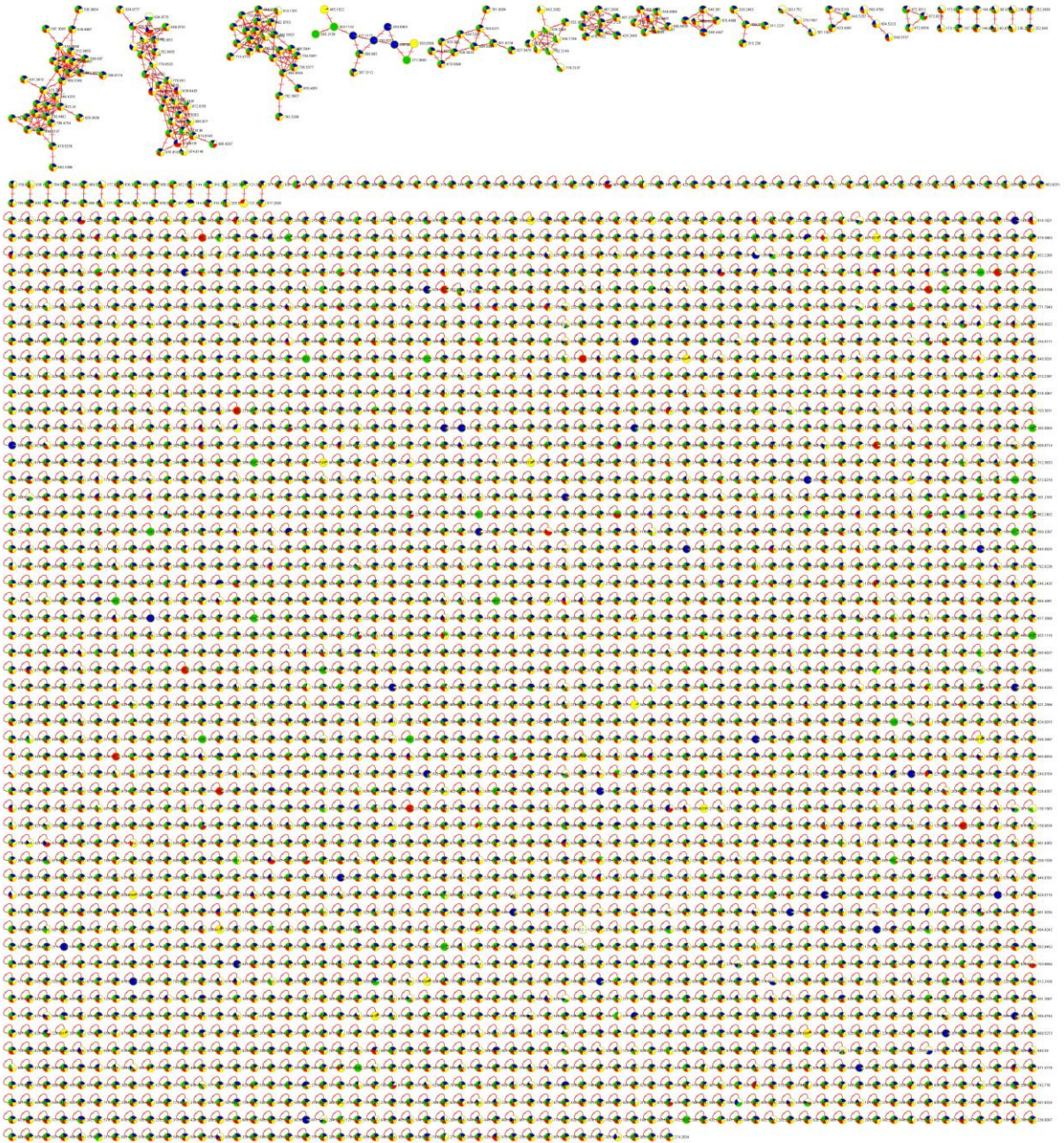
FIGURA A1 - Representação gráfica global da rede molecular de *S. frugiperda* obtida no modo positivo de ionização

FIGURA A2 - Espectro de massas do íon m/z 509.81 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com quercetina

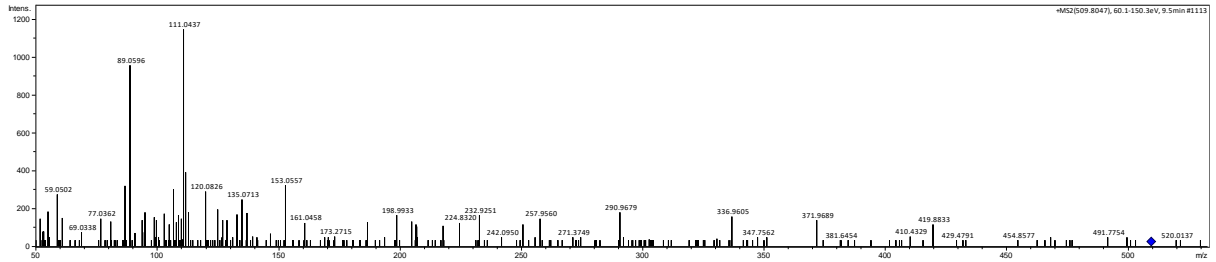


FIGURA A3 - Espectro de massas do íon m/z 367.21 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com quercetina

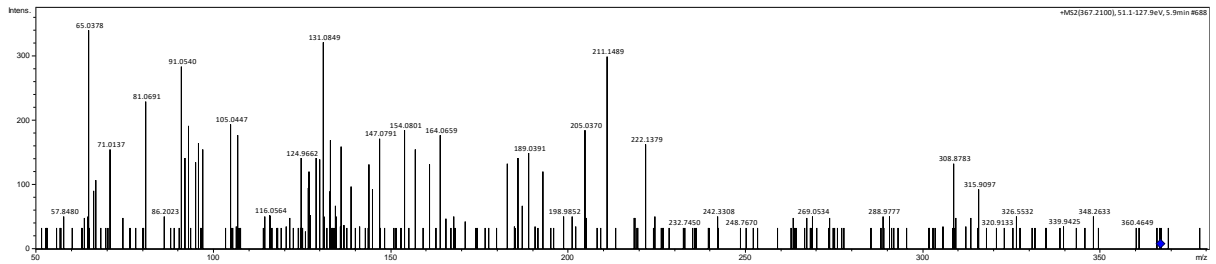


FIGURA A4 - Espectro de massas do íon m/z 509.81 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com naringenina

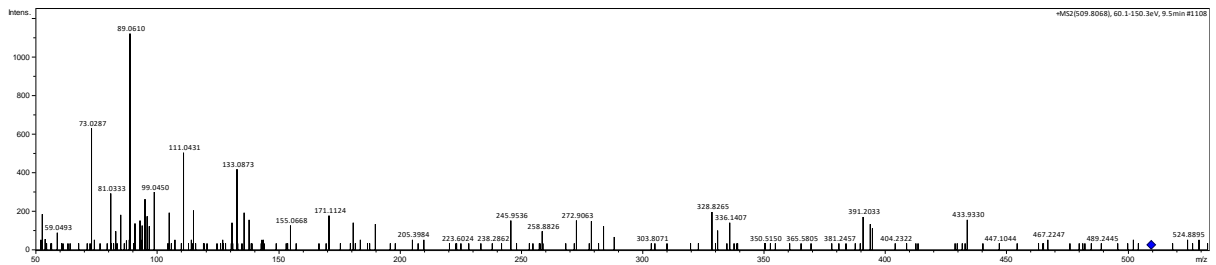


FIGURA A5 - Espectro de massas do íon m/z 367.21 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com naringenina

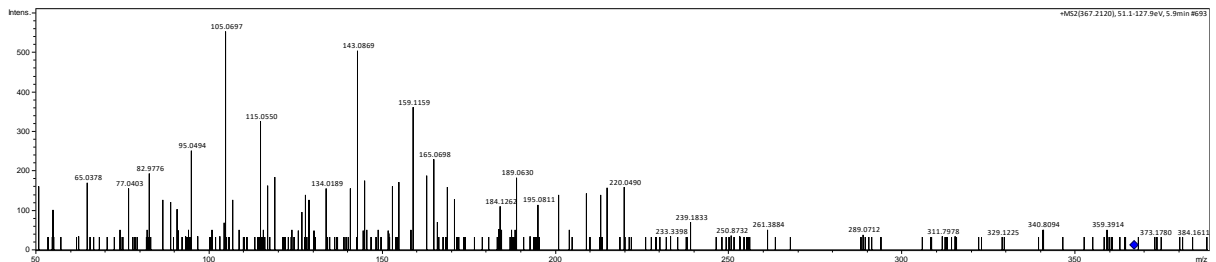


FIGURA A6 - Espectro de massas do íon m/z 509.81 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com daidzeina

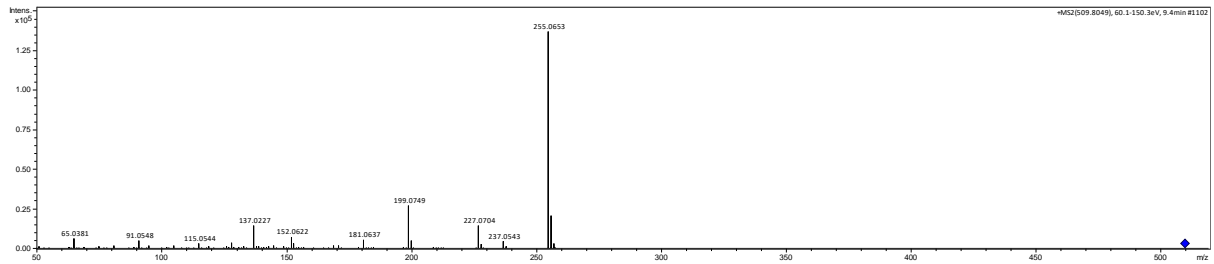


FIGURA A7 - Espectro de massas do íon m/z 367.21 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com daidzeina

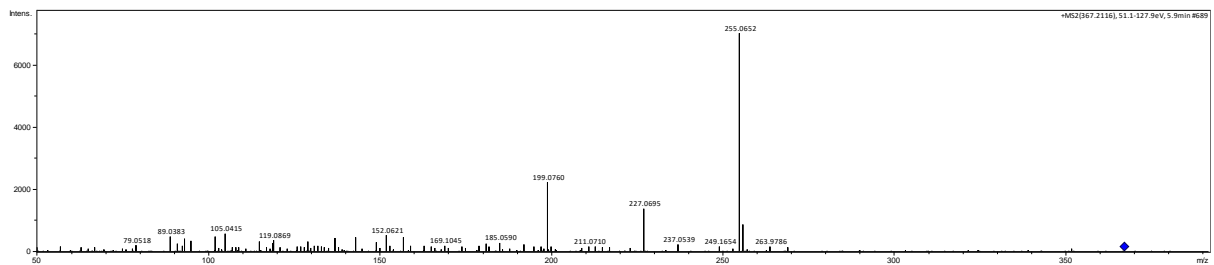


FIGURA A8 - Espectro de massas do íon m/z 509.81 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com genisteina

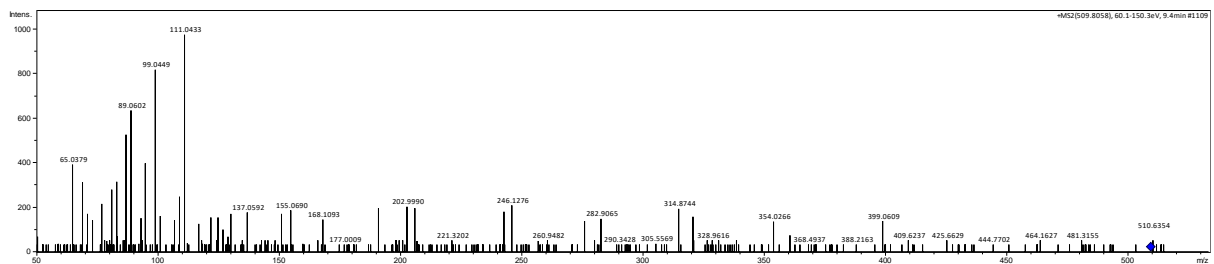


FIGURA A9 - Espectro de massas do íon m/z 367.21 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com genisteina

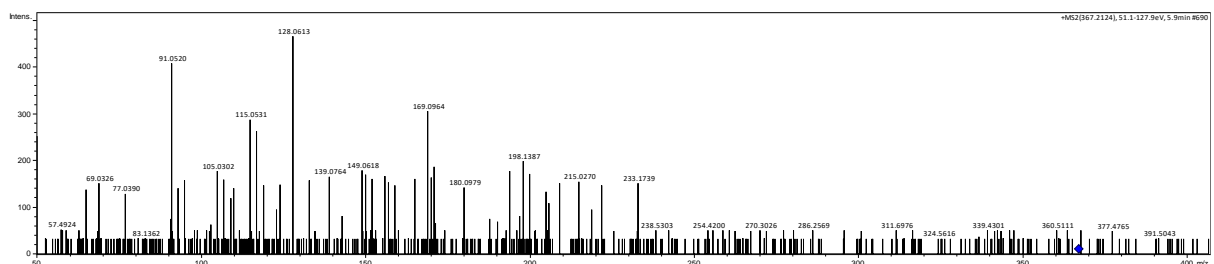


FIGURA A10 - *Mirror match* do íon m/z 417.1177 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como daidzeina 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde.

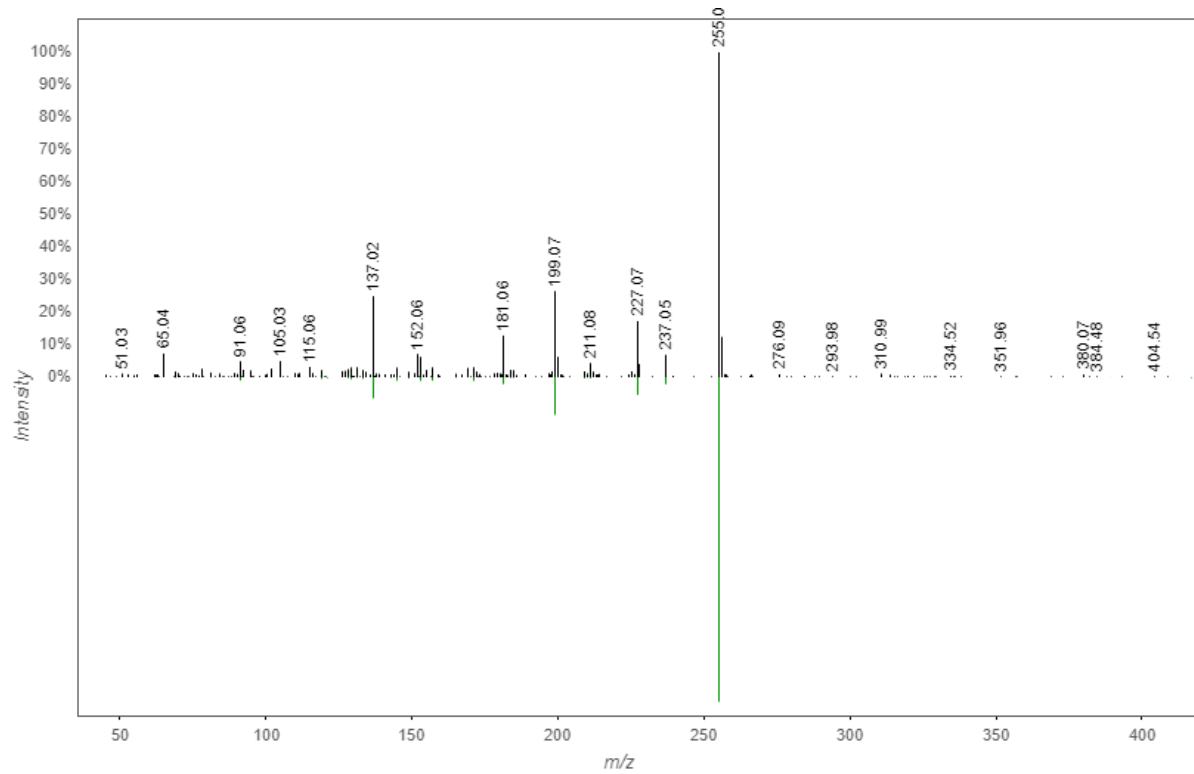


FIGURA A11 - Espectro de massas do íon m/z 417.1179 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com daizeina mostrando a presença da fragmentação 255.06

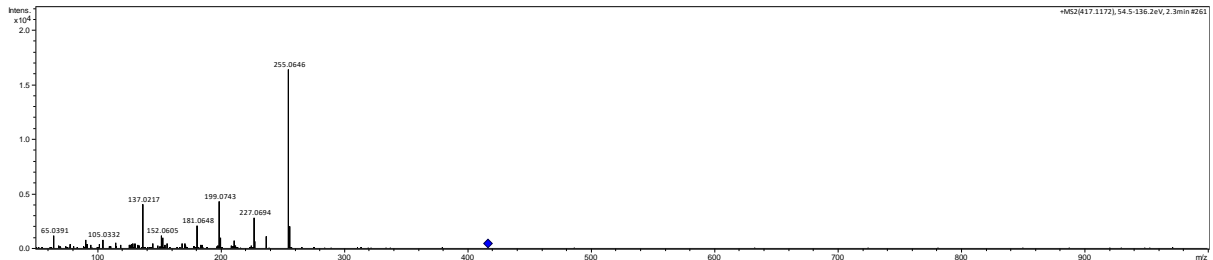


FIGURA A12 - *Mirror match* do íon m/z 433.1132 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como genisteina 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

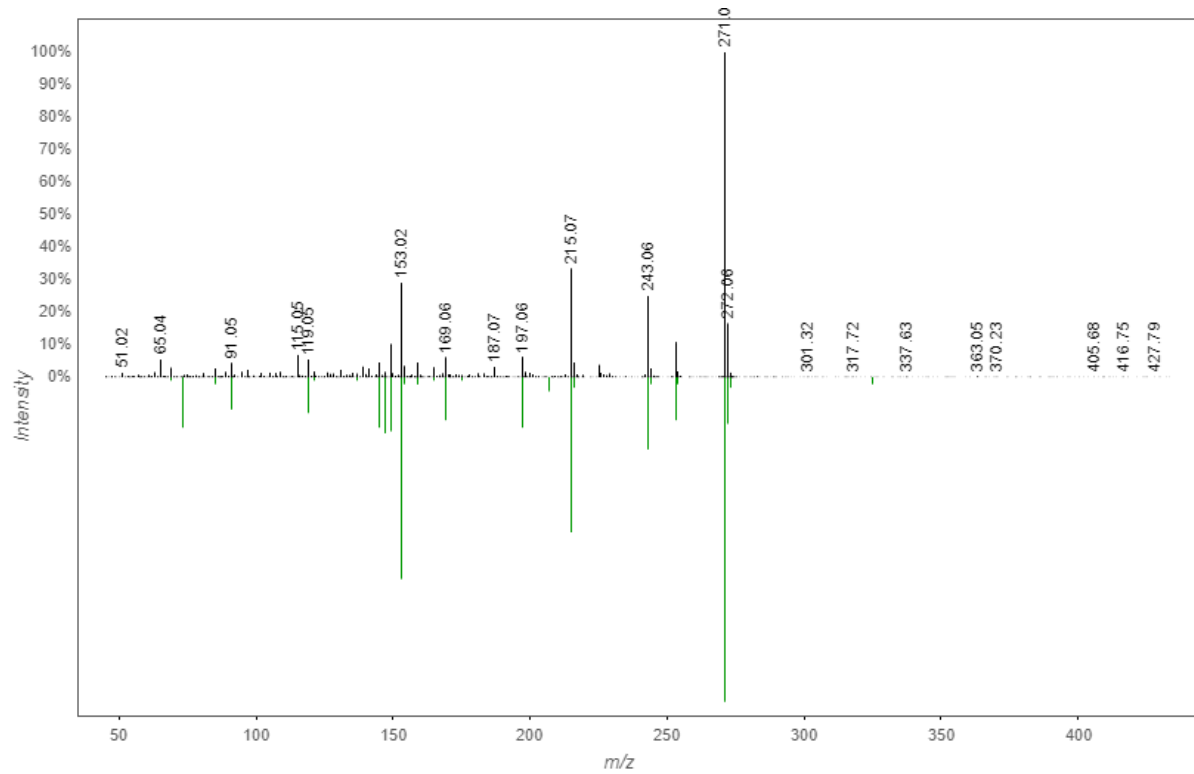


FIGURA A13 - Espectro de massas do íon m/z 433.1132 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com genisteína

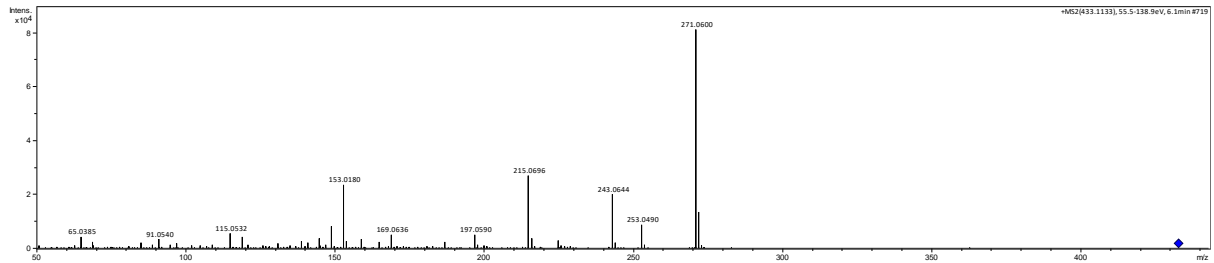


FIGURA A14 - *Mirror match* do íon m/z 465.1022 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como quercetina 3-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

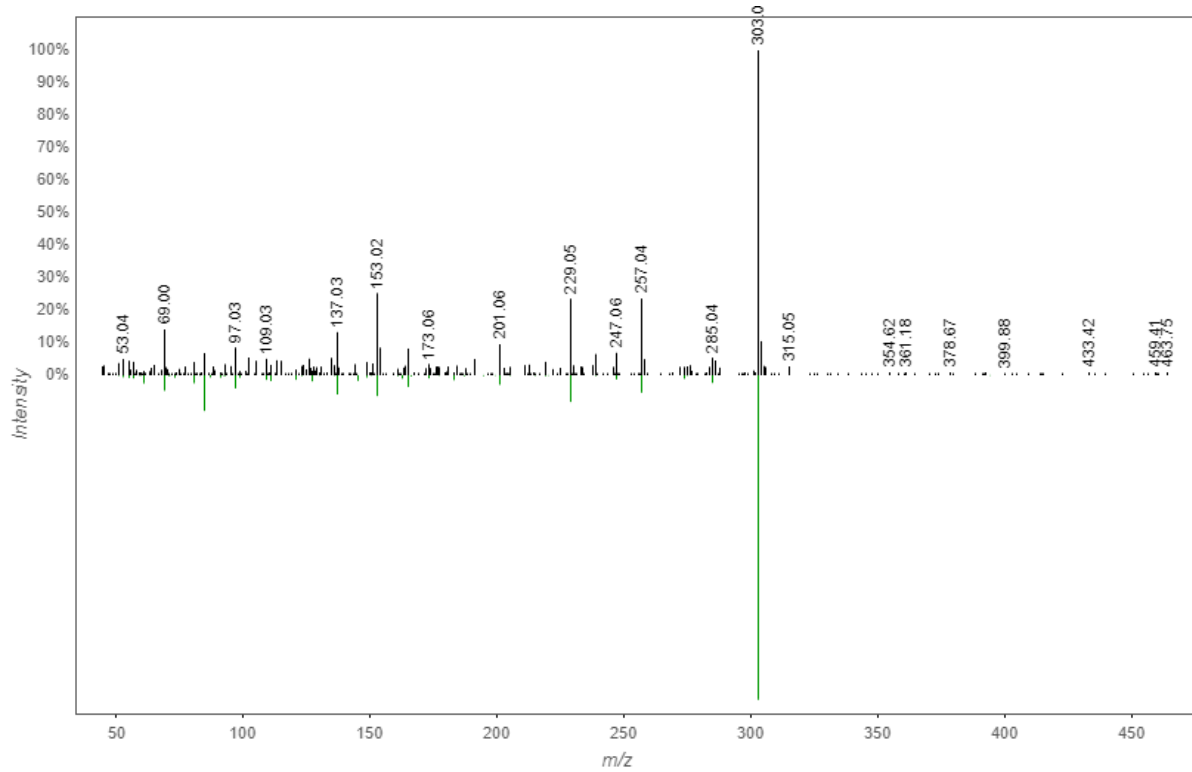


FIGURA A13 - Espectro de massas do íon m/z 465.1022 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com quercetina

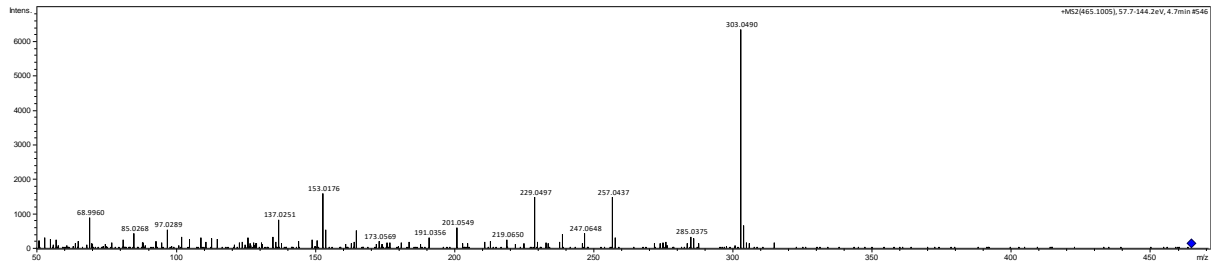


FIGURA A16 - Espectro de massas do íon m/z 417.1187 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com daidzeina mostrando a presença da fragmentação 255.06

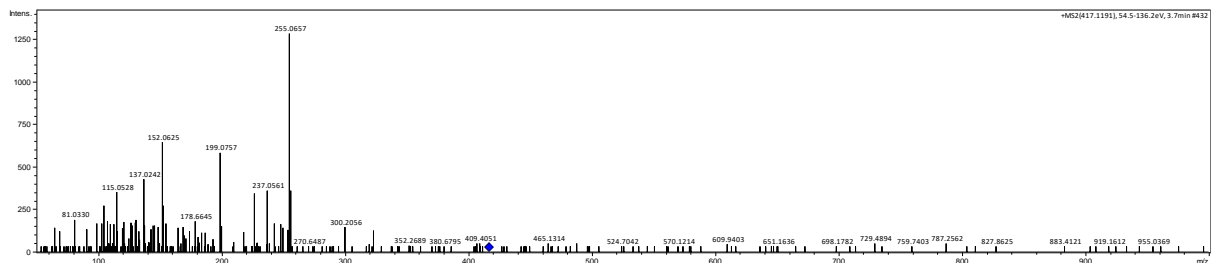


FIGURA A17 - Espectro de massas do íon m/z 335.0220 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com daidzeina

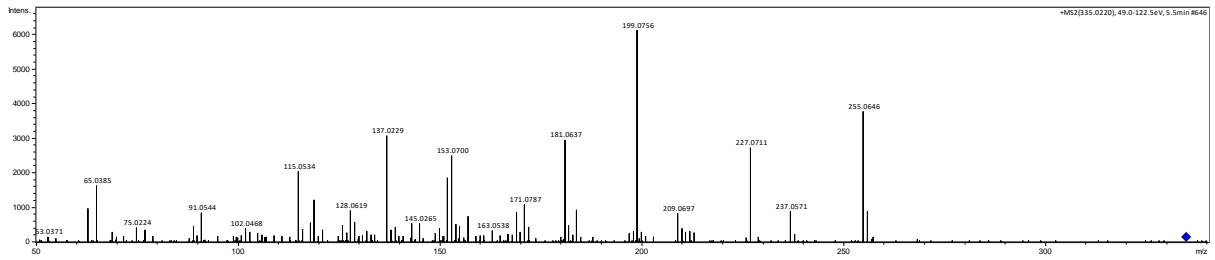


FIGURA A18 - Espectro de massas do íon m/z 283.0964 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com daidzeina

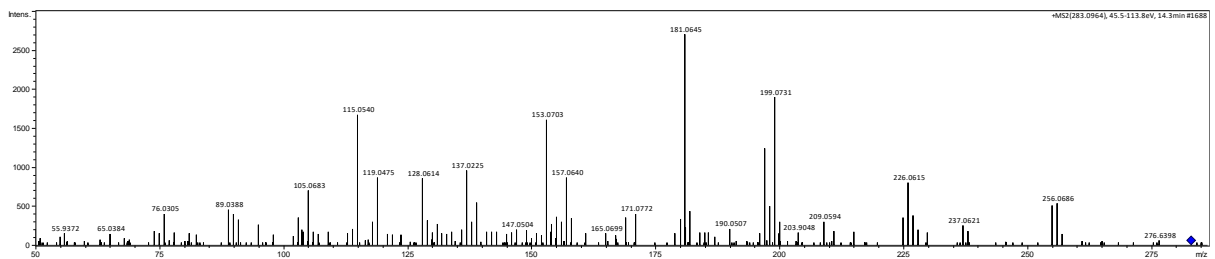


FIGURA A19 - Espectro de massas do íon m/z 433.1127 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com genisteina

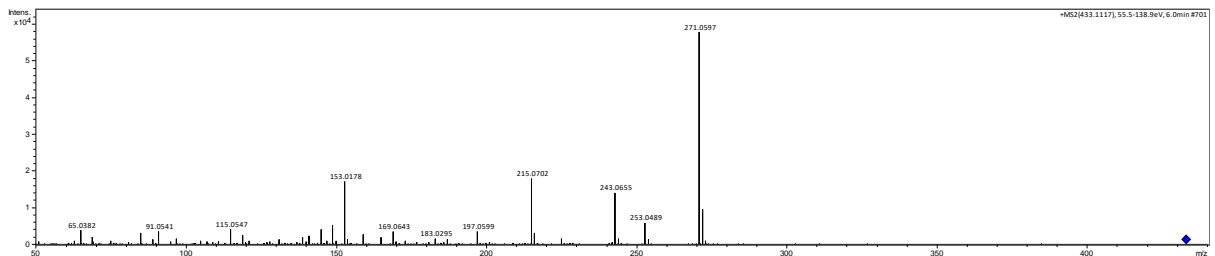


FIGURA A20 - Espectro de massas do íon m/z 351.0164 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com genisteina

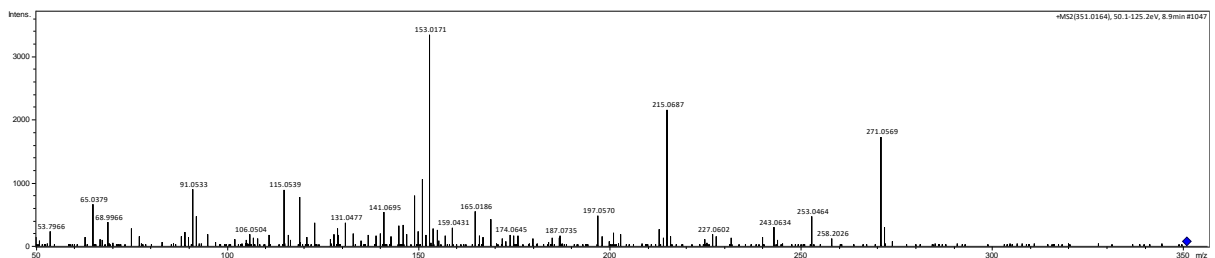


FIGURA A21 - Espectro de massas do íon m/z 435.1261 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com naringenina

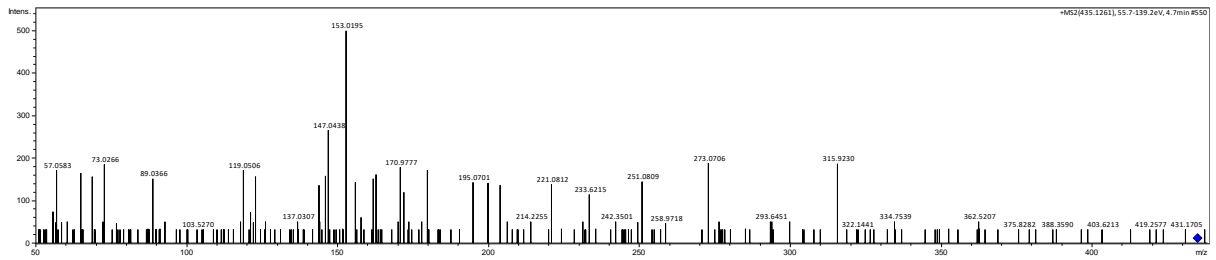


FIGURA A22 - Espectro de massas do íon m/z 597.1836 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com naringenina

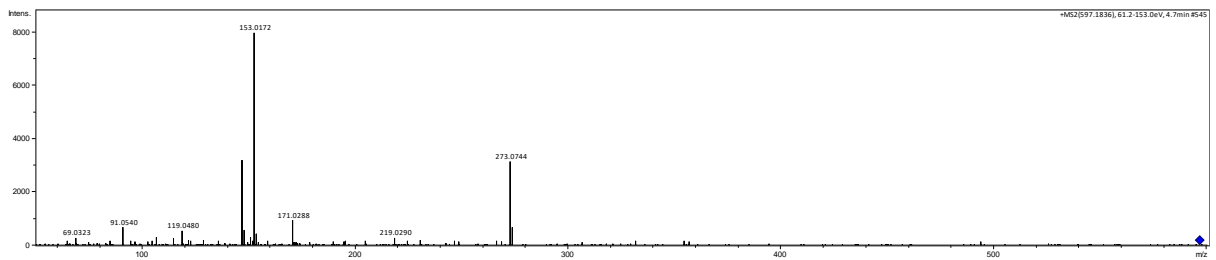


FIGURA A23 - Espectro de massas do íon m/z 353.0317 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com naringenina

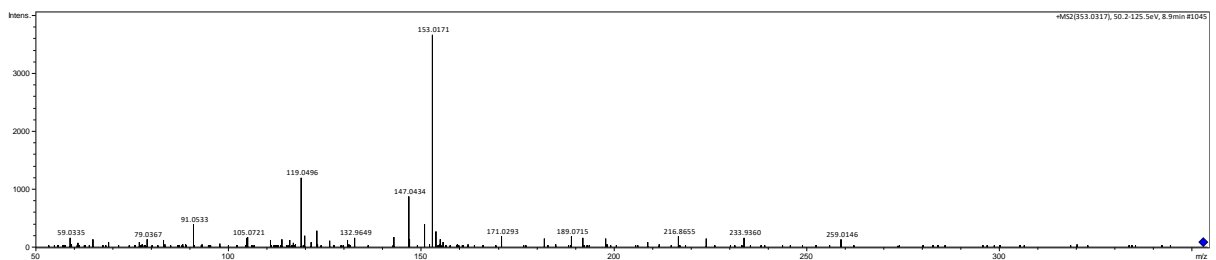


FIGURA A24 - Espectro de massas do íon m/z 465.1013 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com quercetina

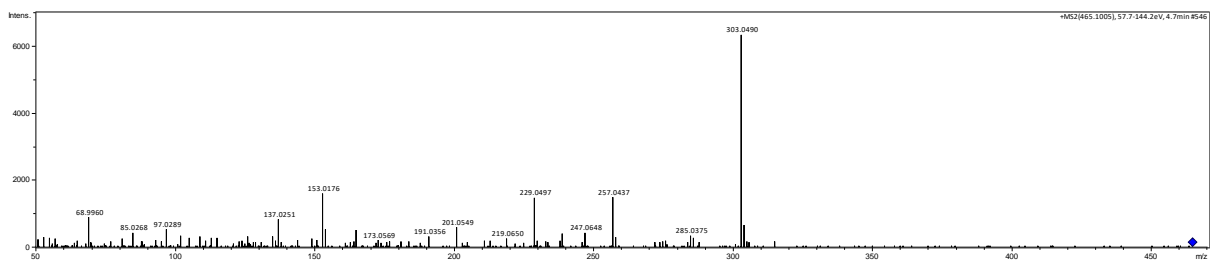


FIGURA A25 - Espectro de massas do íon m/z 545.0582 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com quercetina

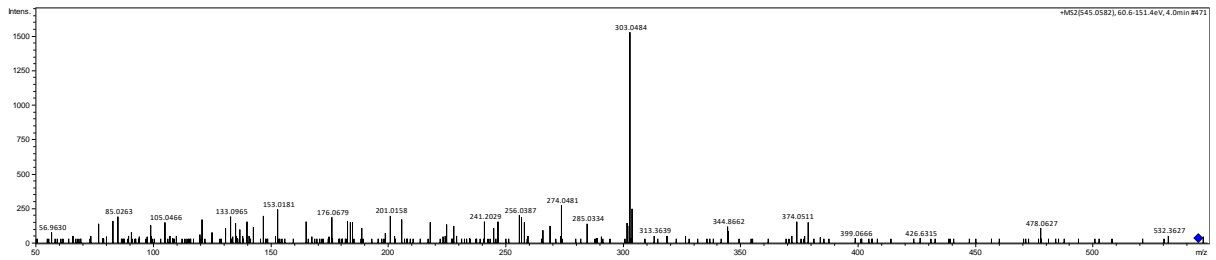


FIGURA A26 - Espectro de massas do íon m/z 317.0638 em extrato de fezes de *S. frugiperda* administradas com quercetina

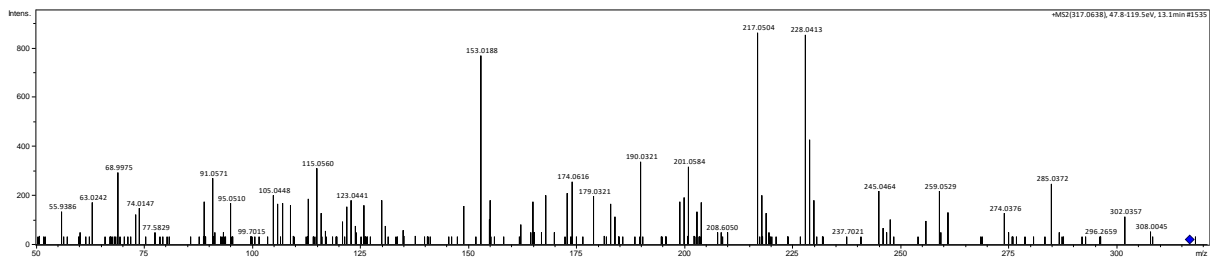


FIGURA A27 - *Mirror match* do íon m/z 417.1178 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como daidzeina 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

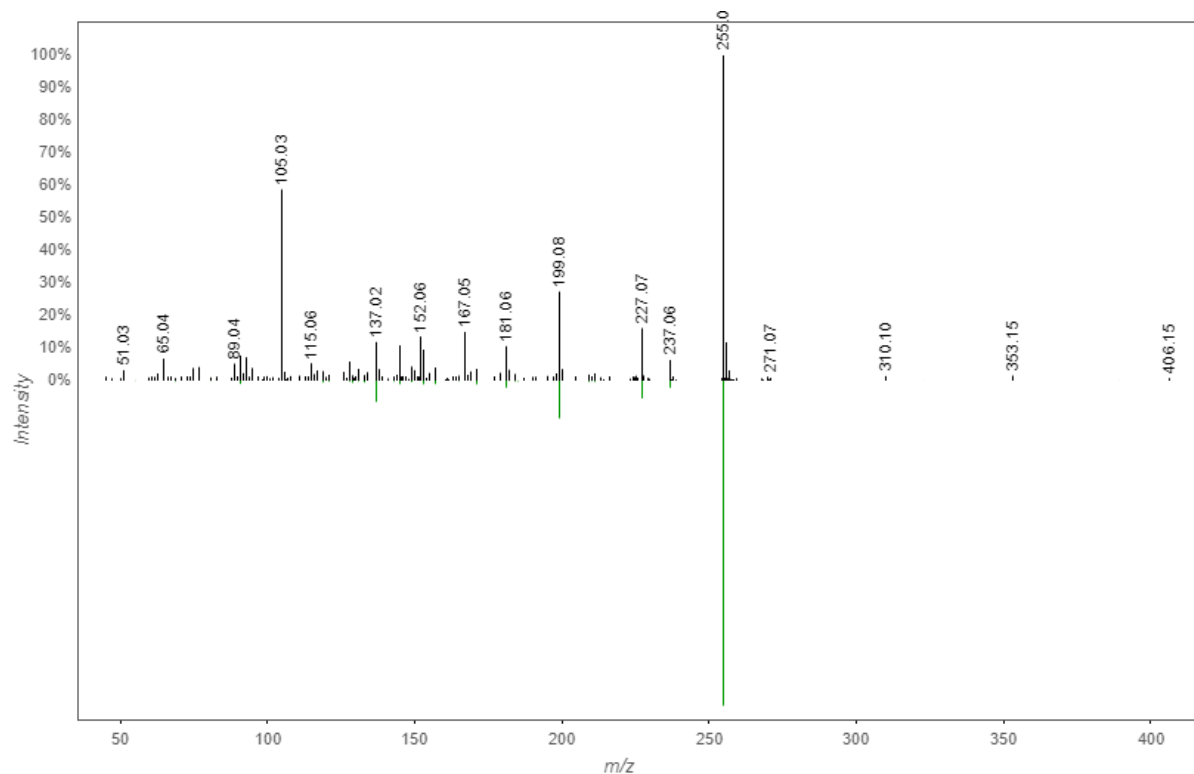


FIGURA A28 - Espectro de massas do íon m/z 417.1178 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com daidzeina

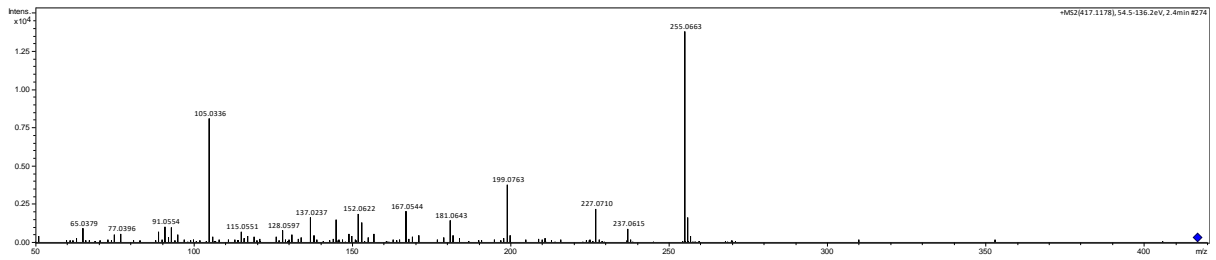


FIGURA A29 - *Mirror match* do íon m/z 433.1159 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como genisteína 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

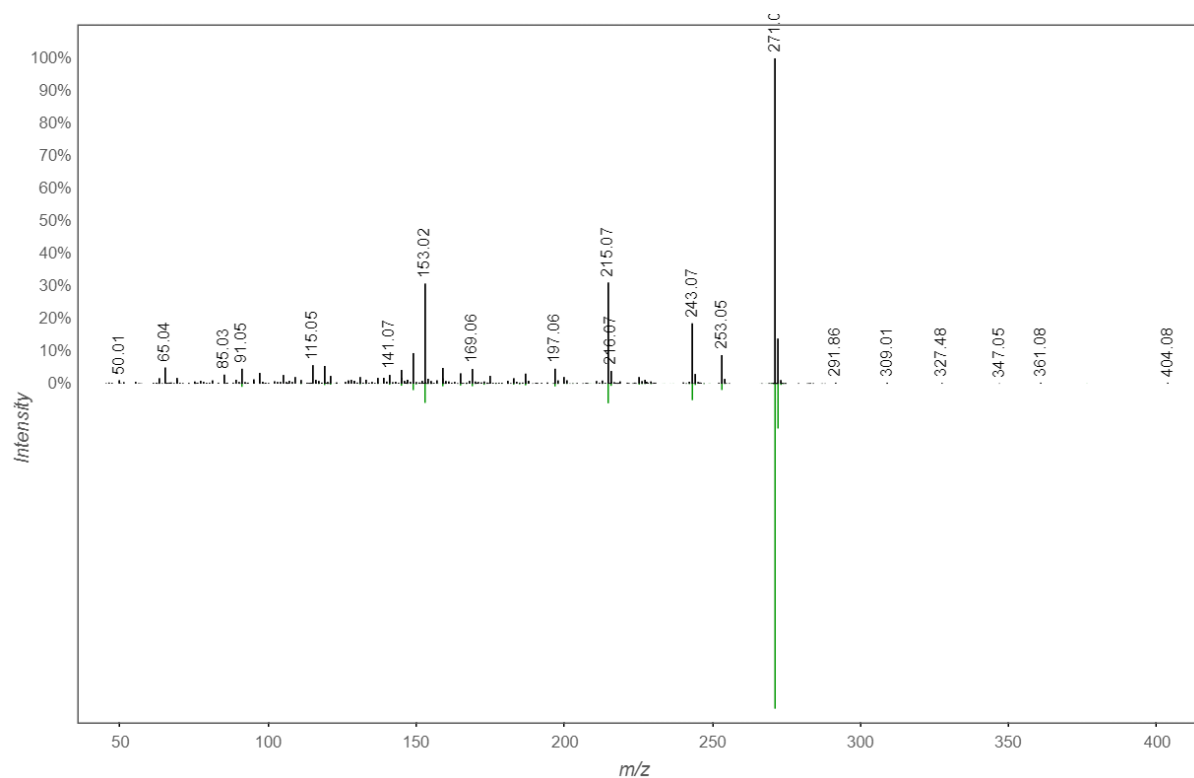


FIGURA A30 - Espectro de massas do íon m/z 433.1159 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com genisteína

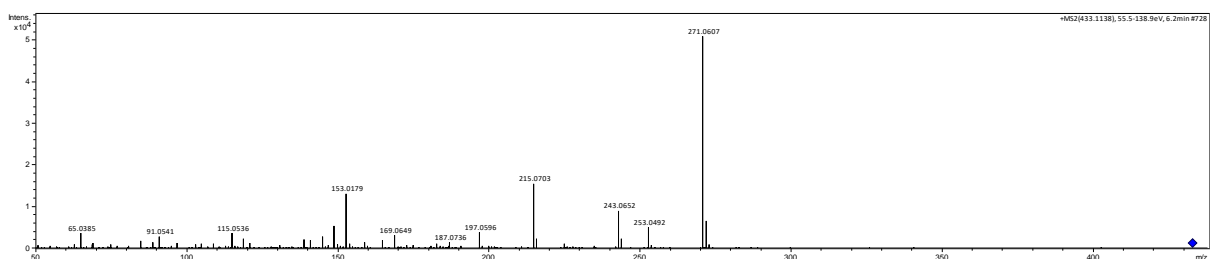


FIGURA A31 - *Mirror match* do íon m/z 465.1061 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como quercetina 4'-*O*-glicosídeo.

O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

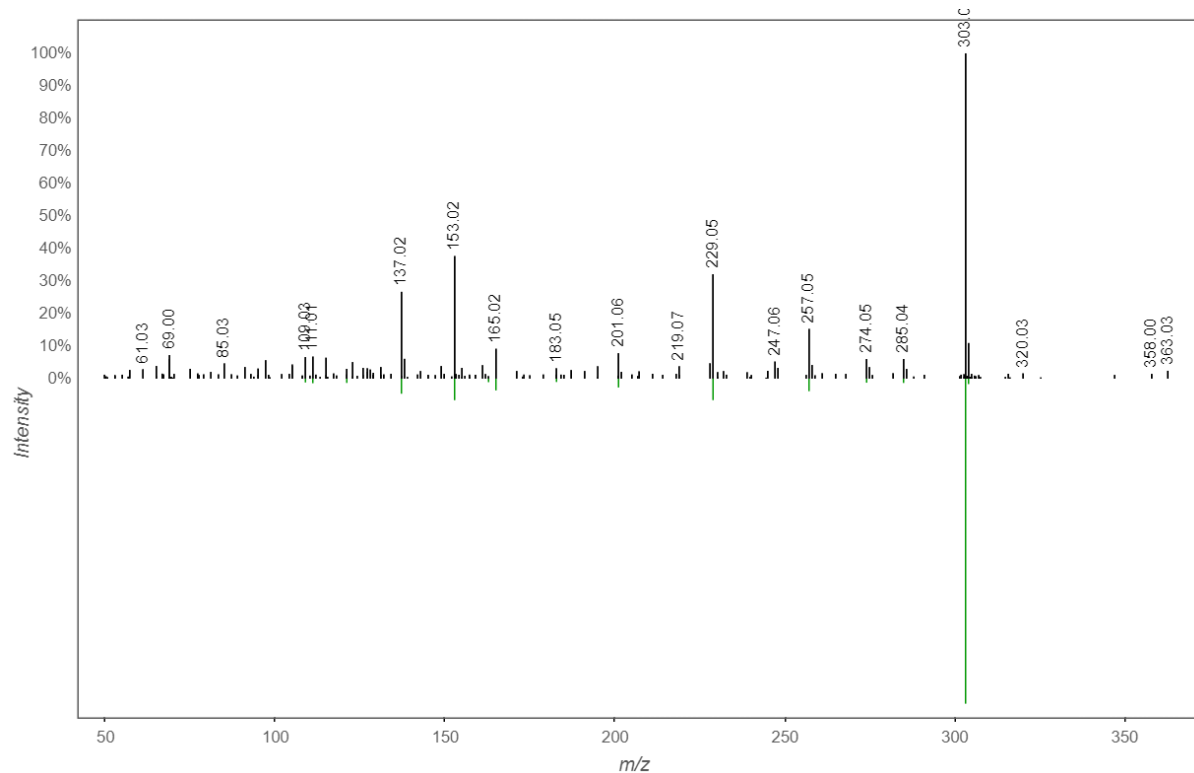


FIGURA A32 - Espectro de massas do íon m/z 465.1061 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com quercetina

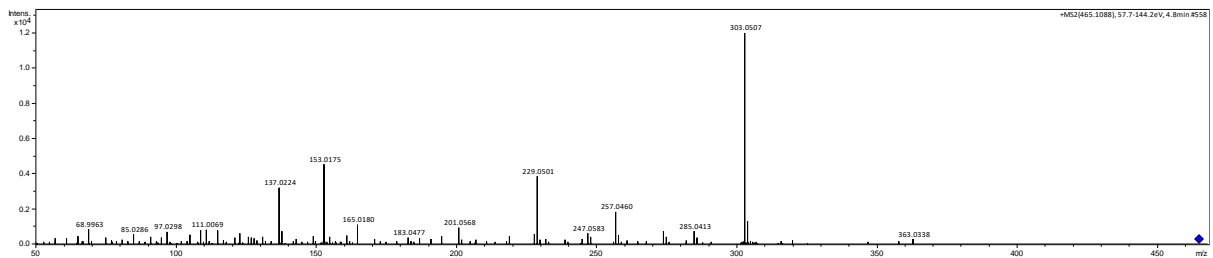


FIGURA A33 - *Mirror match* do íon m/z 435.1311 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como naringenina 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

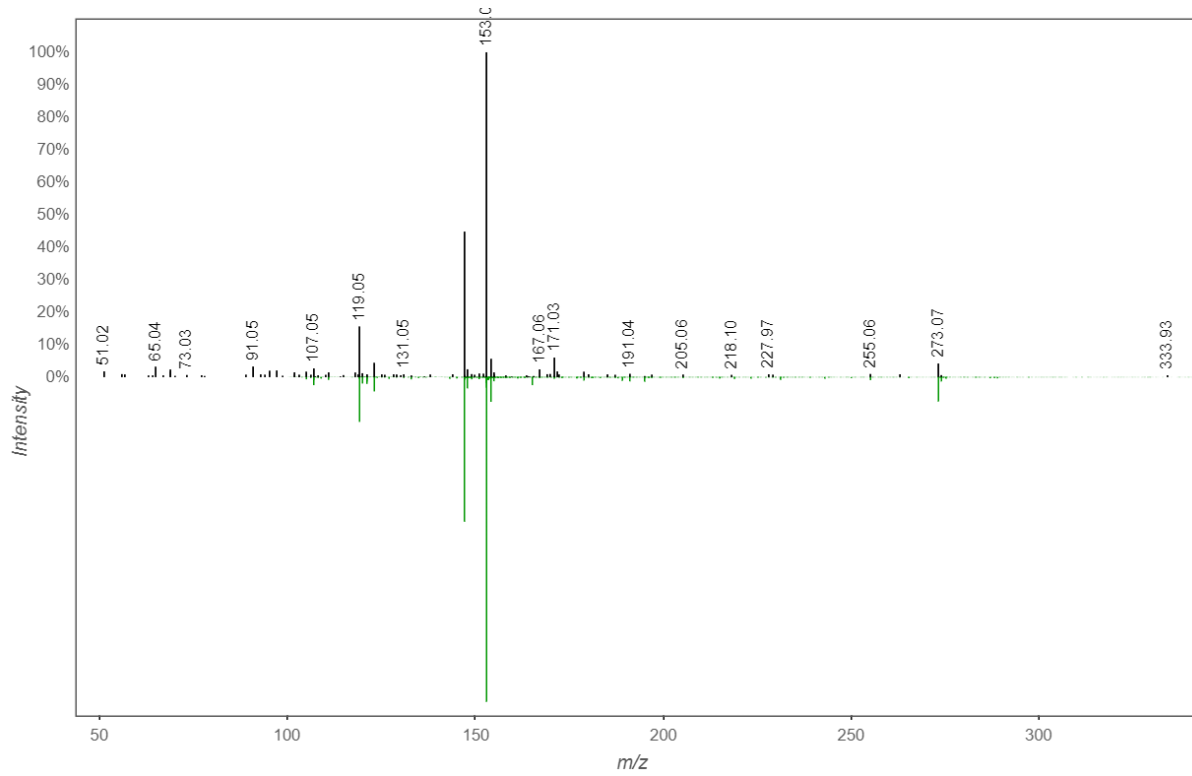


FIGURA A34 - *Mirror match* do íon m/z 435.1288 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como naringenina 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

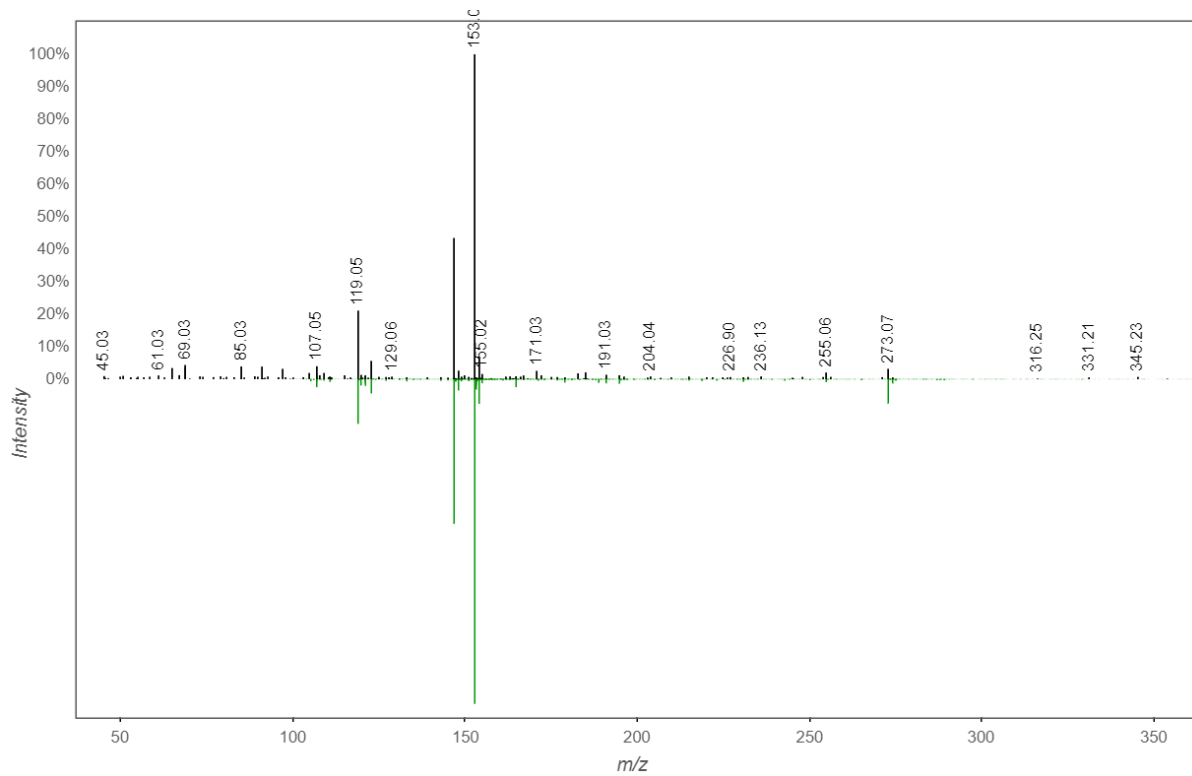


FIGURA A35 - Espectro de massas do íon m/z 435.1311 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com naringenina

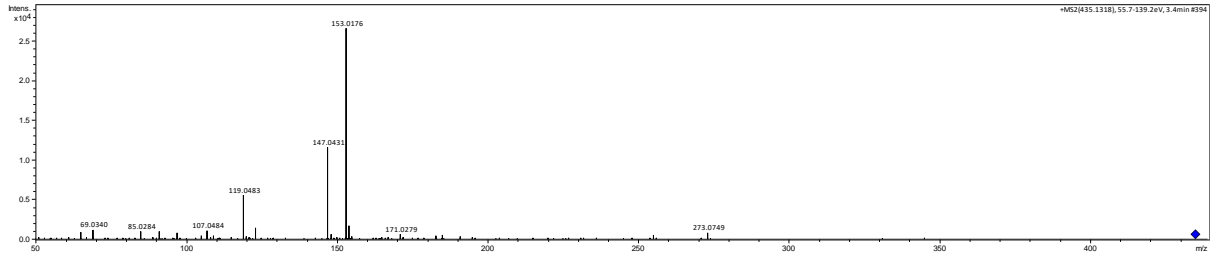


FIGURA A36 - Espectro de massas do íon m/z 435.1288 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com naringenina

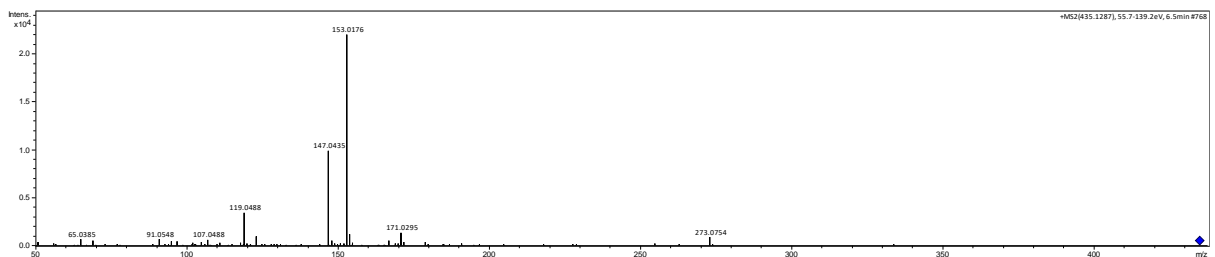


FIGURA A37 - Espectro de massas do íon m/z 335.0242 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com daidzeina

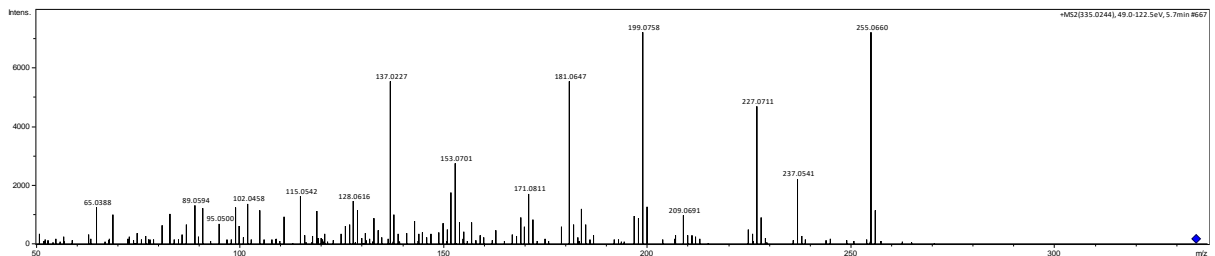


FIGURA A38 - Espectro de massas do íon m/z 351.0180 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com genisteina

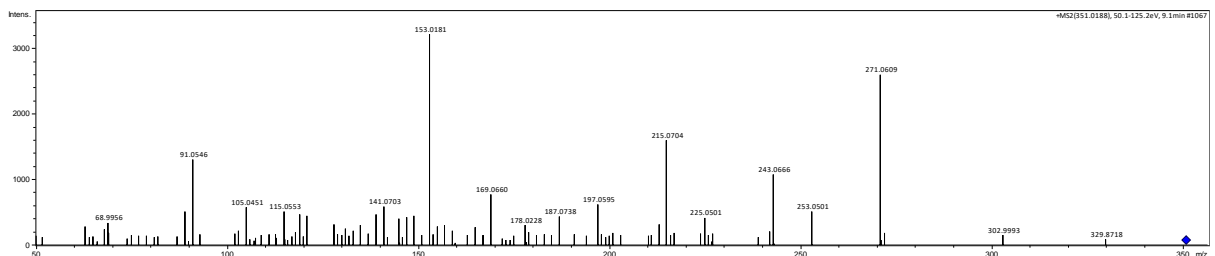


FIGURA A39 - Espectro de massas do íon m/z 353.0340 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com naringenina

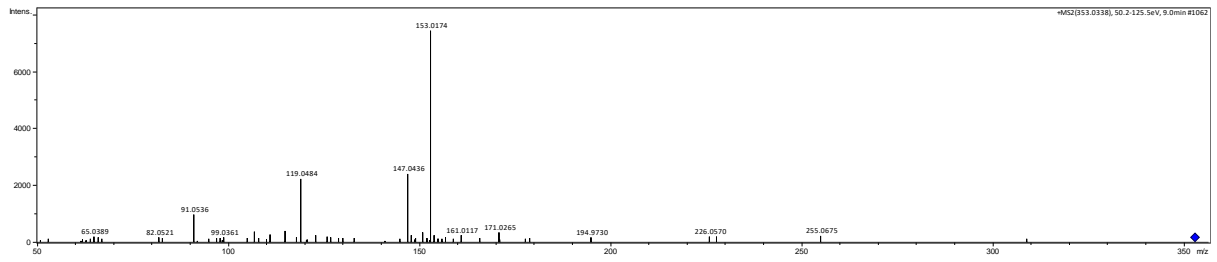


FIGURA A40 - Espectro de massas do íon m/z 317.0663 em extrato de fezes de *S. cosmioides* administradas com quercetina

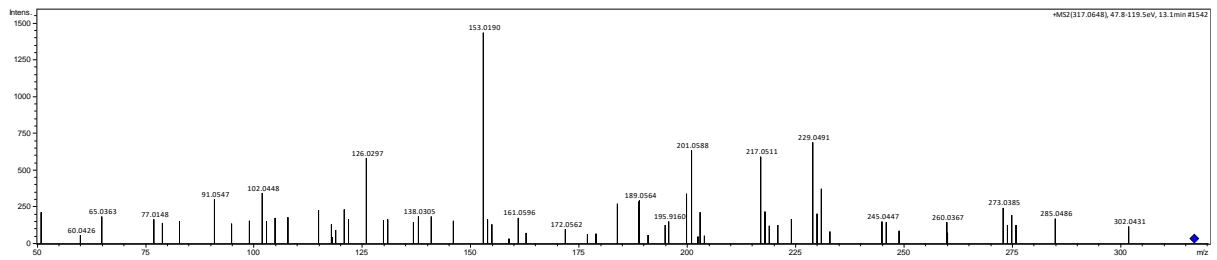


FIGURA A41 - Representação gráfica global da rede molecular de *S. cosmioides* obtida no modo positivo de ionização

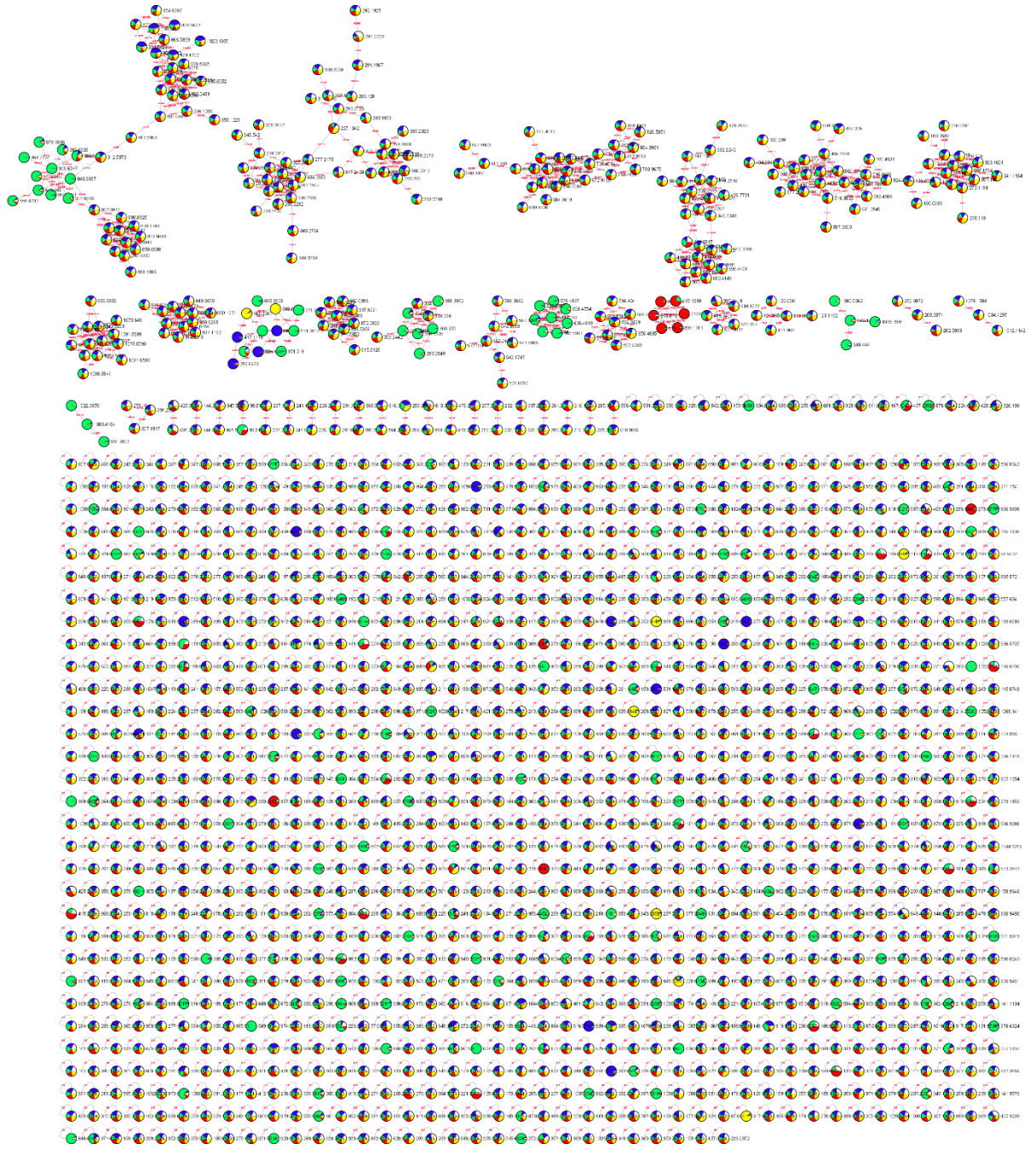


FIGURA A42 - Representação gráfica global da rede molecular de *S. eridania* obtida no modo positivo de ionização

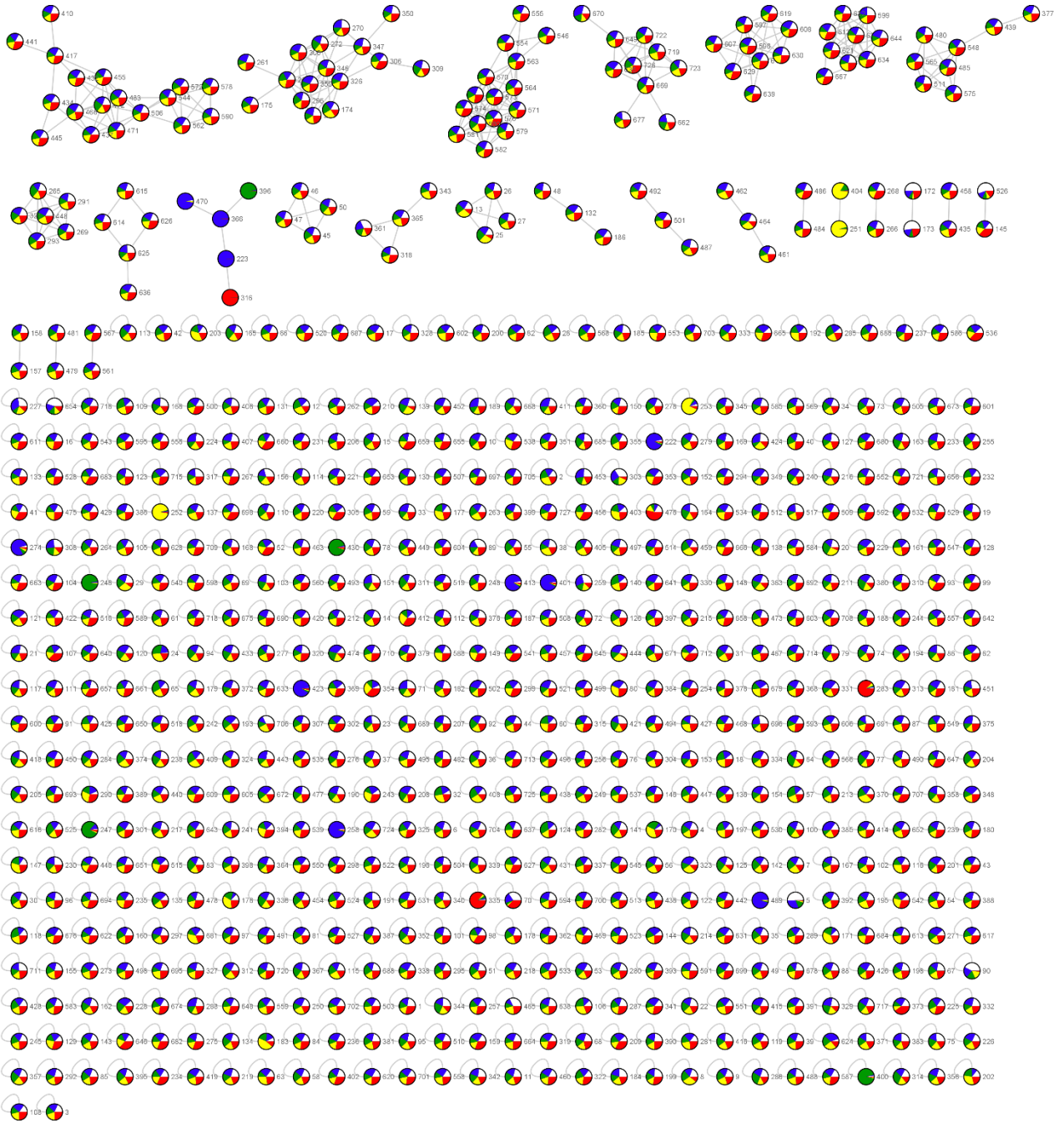


FIGURA A43 - *Mirror match* do íon m/z 417.1168 obtido no modo positivo de ionização, sendo anotado pela plataforma do GNPS como daidzeina 7-*O*-glicosídeo. O espectro de referência é apresentado em preto e o espectro experimental em verde

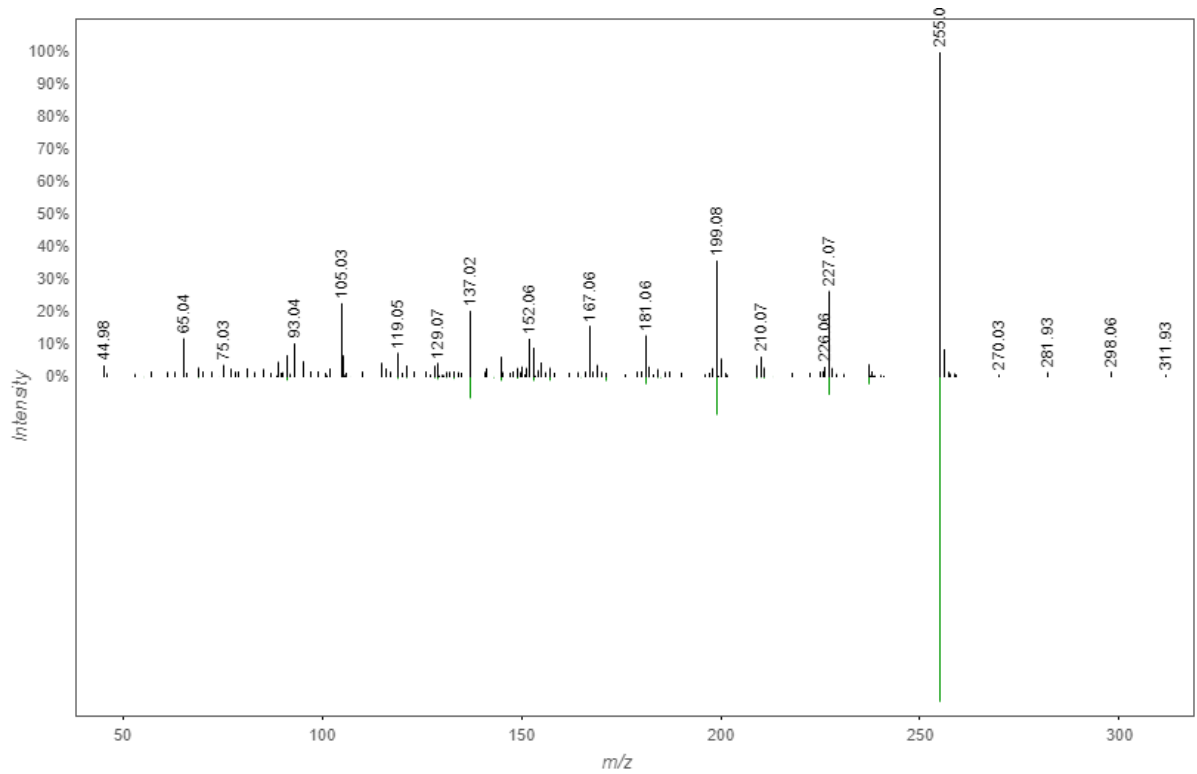


FIGURA A44 - Espectro de massas do íon m/z 417.1168 em extrato de fezes de *S. eridania* administradas com daidzeina

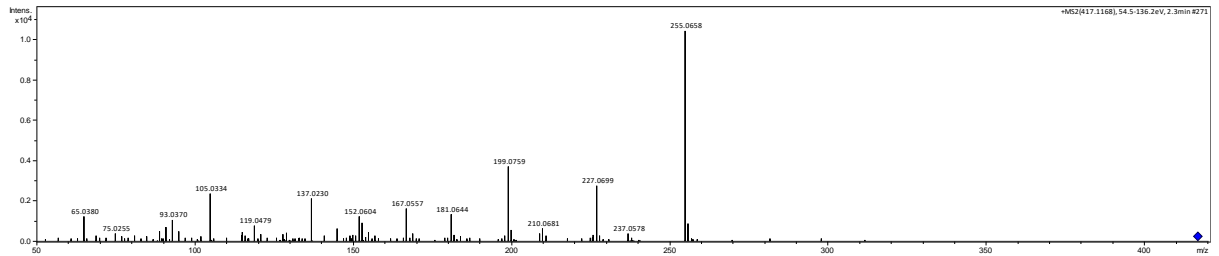


FIGURA A45 - Espectro de massas do íon m/z 363.0519 em extrato de fezes de *S. eridania* administradas com daidzeina

