UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol
Chlosyne lacinia (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae
Tithonia diversifolia e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia
líquida acoplada à espectrometria de massas**

Maria Elvira Poleti Martucci

***Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 30/08/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.**

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol
Chlosyne lacinia (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae
Tithonia diversifolia e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia
líquida acoplada à espectrometria de massas**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção de título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Maria Elvira Poleti Martucci

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo
Neto

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Martucci, Maria Elvira Poleti

Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2012.

86p; il; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Gobbo-Neto, Leonardo.

1. Interação ecoquímica. 2. Asteraceae. 3. Lepidoptera

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Elvira Poleti Martucci

Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação de Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

À minha mãe e à minha irmã

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe e à minha irmã, por todo amor e por todo apoio de uma vida inteira. A vocês, a minha eterna gratidão!

À todos os meus amigos e ao Henrique por tornarem tudo mais leve e agradável. E principalmente por se fazerem sempre presentes, mesmo quando ausentes. Obrigada por todos os momentos!

À Universidade Federal de Alfenas pela minha formação.

Aos colegas e professores do laboratório pela convivência diária tão agradável e pelas sugestões durante a execução deste trabalho. Obrigada por terem me acolhido!

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto pela orientação e pela oportunidade de executar este trabalho. Obrigada por toda atenção!

Aos técnicos do laboratório, em especial ao Tomaz e a Dani, pelo apoio durante os experimentos.

À Universidade de São Paulo pela estrutura para executar este trabalho e pelo programa de pós-graduação.

À Capes pela bolsa concedida.

“ (...) Se em certa altura
Tivesse voltado para esquerda em vez de para a direita;
Se em certo momento
Tivesse dito sim em vez de não, ou não em vez de sim;
Se em certa conversa
Tivesse tido as frases que só agora, no meio-sono, elaboro –
Se tudo tivesse sido assim,
Seria outro hoje e talvez o universo inteiro
Seria insensivelmente levado a ser outro também (...)”
Álvaro de Campos

RESUMO

Martucci, M. E. P **Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.** 2012. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A lagarta da borboleta *Chlosyne lacinia* utiliza como plantas hospedeiras quase exclusivamente espécies da família Asteraceae, tais como *Vernonia sp* e *Tithonia diversifolia*. *V. polyanthes* e *T. diversifolia* apresentam lactonas sesquiterpênicas (LST) em sua constituição química foliar, as quais, entre outras atividades biológicas, podem ser deterrentes e tóxicas para lepidópteros. Os objetivos deste trabalho foram investigar se os metabólitos secundários das Asteraceae *V. polyanthes* e *T. diversifolia* são metabolizados, excretados intactos e/ou sequestrados durante a fase larval de *C. lacinia*, e se são conservados pelo adulto, elucidando, assim, parte da interação ecoquímica da lagarta-do-girassol com Asteraceae. Os extratos das folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia* permitiram a identificação de 22 substâncias entre ácidos clorogênicos, flavonoides e LST. As folhas de *V. polyanthes* apresentaram 12 destas substâncias, sendo estas, ácidos clorogênicos, flavonoides glicuronizados e LST do subtipo hirsutinolido. Já as folhas de *T. diversifolia* apresentaram 13 das 22 substâncias, tais como ácidos clorogênicos e LST dos subtipos furanoeliangolido e heliangolido. As lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia* se desenvolveram até o quarto estágio completando a metamorfose para a fase adulta, enquanto que as lagartas cultivadas em *V. polyanthes* se desenvolveram apenas até o segundo estágio. Além disso, o peso médio das lagartas no segundo estágio larval dos três cultivos feitos com *T. diversifolia* foi estatisticamente maior do que o peso médio das lagartas no mesmo estágio dos três cultivos feitos com *V. polyanthes*. Assim provavelmente, a diferença na composição química das duas plantas pode ter sido responsável pela diferença na performance de *C. lacinia*. Além disso, as lagartas no terceiro e no quarto estágios, alimentadas com *T. diversifolia*, acumularam metabólitos secundários ingeridos a partir das folhas, principalmente LST. Em relação à excreção, as lagartas tratadas com *T. diversifolia* foram capazes de excretar alguns metabólitos sob a forma inalterada em todos os estágios larvais, já as lagartas tratadas com *V. polyanthes* excretaram apenas flavonoides glicuronizados sob a forma inalterada e duas flavonas. Enquanto que as lagartas do segundo estágio cultivadas em *V. polyanthes*, apresentaram acúmulo apenas do flavonoide apigenina-7-O-glicuronil e do ácido 3-O-E-cafeoilquínico hidroxilado. Sugere-se que a presença de flavonoides glicuronizados e LST do subtipo hirsutinolido em *V. polyanthes* justifica, ao menos parcialmente, o desenvolvimento deficiente e a morte de *C. lacinia* quando cultivada com esta planta. Por outro lado, a presença de LST dos subtipos furanoeliangolido e heliangolido nas folhas de *T. diversifolia* podem ser favoráveis ao desenvolvimento completo deste herbívoro na presença desta planta.

Palavras-chaves: Asteraceae, Lepidoptera, Interação planta-inseto.

ABSTRACT

Martucci, M. E. P **Analysis of the ecochemical interaction between the sunflower caterpillar *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) and the Asteraceae *Tithonia diversifolia* and *Vernonia polyanthes* using liquid chromatography coupled to mass spectrometry.** 2012. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The caterpillar of *Chlosyne lacinia* uses almost exclusively Asteraceae species as host plant, such as *Vernonia sp* and *Tithonia diversifolia*. *V. polyanthes* and *T. diversifolia* show sesquiterpene lactones (STL) in their chemistry composition. STL have biological activities and also can be feeding deterrents and toxics for Lepidoptera. The aims of this study were to investigate whether secondary metabolites of the Asteraceae *V. polyanthes* and *T. diversifolia* are metabolized, excreted intact and/or sequestered during larval stage of *C. lacinia*, and if they are retained by adult, thus explaining a part of the ecochemical interaction between sunflower caterpillar and Asteraceae. The extracts of leaves of *V. polyanthes* e *T. diversifolia* allowed the identification of 22 substances among chlorogenic acids, flavonoids and STL. The leaves of *V. polyanthes* presented 12 of these substances, which were chlorogenic acids, flavonoids glucuronides and STL of hirsutinolide subtype, whereas the leaves of *T. diversifolia* had 13 of these substances, such as chlorogenic acids and STL of furanoeliangolide and heliangolide subtypes. The caterpillars of *C. lacinia* cultivated with *T. diversifolia* developed up to the fourth stage, completing the metamorphosis into adult stage, while the caterpillars cultivated with *V. polyanthes* developed only until to the second stage. Moreover the average weight of caterpillars in the second stage of three replicates made with *T. diversifolia* was statistically higher than the average weight of caterpillars at the same stage of the three replicates made with *V. polyanthes*. The difference in chemical composition of the two plants may has been responsible for the difference in the performance of *C. lacinia* crops. Also, the caterpillars in the third and fourth stages cultivated with *T. diversifolia* accumulated secondary metabolites taken from these leaves, mainly STL. Regarding the excretion, caterpillars in all stages fed with *T. diversifolia* were able to excrete unchanged metabolites, while caterpillars fed with *V. polyanthes* excreted only unchanged flavonoids glucuronide and the respective aglicones. In the other hand, the caterpillars in the second stage cultivated in *V. polyanthes* showed that there was only accumulation of apigenin-7-*O*-glucuronyl and 3-hydroxy-*O*-*E*-caffeoylquinic acid. It is suggested that the presence of flavonoids glucuronides and STL of hirsutinolide subtype in *V. polyanthes*, justify, at least partially, defective development and deaths of *C. lacinia* cultivated with this plant. While the presence of STL of furanoheliangolide and heliangolide subtypes in *T. diversifolia* may be favorable to the full development of this herbivore in the presence of this plant.

Keywords: Asteraceae, Lepidoptera, plant-insect interaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos sinais cromatográficos dos extratos das folhas de <i>V. polyanthes</i> <i>T. diversifolia</i> e dados de UV e espectrometria de massas obtidos por CLAE-UV-EM.....	27
Tabela 2. Identificação dos sinais cromatográficos referentes aos compostos formados pela metabolização por <i>C. lacinia</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>C. lacinia</i> (fotos: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto)	7
Figura 2. <i>Tithonia diversifolia</i> e <i>Vernonia polyanthes</i> (fotos: Maria Elvira Poleti Martucci)	9
Figura 3. Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de <i>T. diversifolia</i> e <i>V. polyanthes</i> , respectivamente	26
Figura 4. Estruturas químicas dos ácidos clorogênicos e flavonoides identificados nas folhas de <i>T. diversifolia</i> e <i>V. polyanthes</i>	32
Figura 5. Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas identificadas nas folhas de <i>T. diversifolia</i> e <i>V. polyanthes</i>	33
Figura 6. Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de <i>T. diversifolia</i> e das lagartas cultivadas em <i>T. diversifolia</i> no 2º, 3º e 4º estágios, respectivamente	39
Figura 7. Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de <i>T. diversifolia</i> e das fezes das lagartas cultivadas em <i>T. diversifolia</i> no 2º, 3º e 4º estágios, respectivamente	40
Figura 8. Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de <i>T. diversifolia</i> , das asas e corpo das borboletas e da hemolinfa, respectivamente	41
Figura 9. Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de <i>V. polyanthes</i> , das lagartas cultivadas em <i>V. polyanthes</i> e das fezes das lagartas, respectivamente.....	42
Figura 10. Peso médio das triplicatas das lagartas de <i>C. lacinia</i> alimentadas com <i>T. diversifolia</i> (Td) e <i>V. polyanthes</i> (Vp) em cada estágio do seu desenvolvimento... ..	46
Figura 11. Identificação do sinal cromatográfico 1. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	63
Figura 12. Identificação do sinal cromatográfico 2. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	64
Figura 13. Identificação do sinal cromatográfico 3. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	65
Figura 14. Identificação do sinal cromatográfico 4. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	66
Figura 15. Identificação do sinal cromatográfico 5. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	67
Figura 16. Identificação do sinal cromatográfico 6. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	68

Figura 17. Identificação do sinal cromatográfico 7. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	69
Figura 18. Identificação do sinal cromatográfico 8. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	70
Figura 19. Identificação do sinal cromatográfico 9. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	71
Figura 20. Identificação do sinal cromatográfico 10. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	72
Figura 21. Identificação do sinal cromatográfico 11. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	73
Figura 22. Identificação do sinal cromatográfico 12. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	74
Figura 23. Identificação do sinal cromatográfico 13. Espectro de massas no modo de ionização positivo	75
Figura 24. Identificação do sinal cromatográfico 14. Espectro de massas no modo de ionização positivo	76
Figura 25. Identificação do sinal cromatográfico 15. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	77
Figura 26. Identificação do sinal cromatográfico 16. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	78
Figura 27. Identificação do sinal cromatográfico 17. Espectro de massas no modo de ionização positivo	79
Figura 28. Identificação do sinal cromatográfico 18. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	80
Figura 29. Identificação do sinal cromatográfico 19. Espectro de massas no modo de ionização positivo	81
Figura 30. Identificação do sinal cromatográfico 20. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	82
Figura 31. Identificação do sinal cromatográfico 21. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	83
Figura 32. Identificação do sinal cromatográfico 22. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).....	84
Figura 33. Identificação do sinal cromatográfico 23. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	85
Figura 34. Identificação do sinal cromatográfico 24. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo	86

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
UV	Ultravioleta
DAD	Detector com arranjo de diodos
EM	Espectrometria de massas
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrila
HAc	Ácido acético
sh	Ombro
CQA	Ácido cafeoilquínico
AQ	Ácido quínico
FQA	Ácido feruloilquínico
LST	Lactona sesquiterpênica
MeAcr	Metacrilato
Tig	Tiglato
iBu	Isobutil

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
m/z	Relação massa/carga

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Abreviaturas	vii
Lista de Símbolos	viii
1.Introdução	1
1.1 Interações inseto-planta	1
1.2 <i>Chlosyne lacinia</i> e suas plantas hospedeiras	3
1.3 <i>Vernonia polyanthes</i> Less e <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	7
1.4 Análises metabolômicas	11
2.Objetivos	13
3.Material e Métodos	14
3.1 Equipamentos para análises por CLAE-UV-EM	14
3.2 Obtenção de <i>C. lacinia</i>	14
3.2.1 Coleta em campo	14
3.2.2 Cultivo em laboratório	14
3.2.2.1 Cultivo da fase larval	15
3.2.2.2 Cultivo da fase adulta	15
3.3 Avaliação da performance de <i>C. lacinia</i>	16
3.4 Obtenção de amostras para análise	16
3.4.1 Amostras vegetais	16
3.4.2 Amostras de <i>C. lacinia</i>	16
3.5 Preparo dos extratos para análise por CLAE-UV-EM	17
3.6 Análises por CLAE-UV-EM	18
3.7 Identificação dos picos cromatográficos	18
4.Resultados e Discussão	20
4.1 Identificação dos sinais cromatográficos presentes no extrato das folhas de <i>T. diversifolia</i> e no extrato das folhas de <i>V. polyanthes</i>	20
4.1.1 Ácidos Clorogênicos	20

4.1.2	Flavonoides.....	22
4.1.3	Lactonas sesquiterpênicas.....	24
4.2	Identificação dos sinais cromatográficos dos extratos das fezes, das lagartas, da hemolinfa, do corpo e da asa de <i>C. lacinia</i> cultivadas em <i>T. diversifolia</i> e em <i>V. polyanthes</i>	35
4.2.1	Identificação dos sinais cromatográficos dos extratos das fezes, das lagartas, da hemolinfa, do corpo e da asa de <i>C. lacinia</i> cultivadas em <i>T. diversifolia</i>	35
4.2.2	Identificação dos sinais cromatográficos dos extratos das fezes e das lagartas de <i>C. lacinia</i> cultivadas em <i>V. polyanthes</i>	38
4.3	Experimentos de performance de <i>C. lacinia</i> em <i>T. diversifolia</i> e em <i>V. polyanthes</i>	47
5.	Conclusões.....	51
6.	Referências Bibliográficas	53
	Apêndices.....	63

1. Introdução

1.1 Interações inseto-planta

As plantas apresentam uma enorme diversidade de metabólitos secundários, em parte atribuída às suas interações com os herbívoros (BANCHIO et al., 2005). Tais metabólitos podem apresentar diversos mecanismos de defesa contra herbívoros, tais como rompimento de membrana, inibição de transporte ou sinal de transdução, alterações metabólicas e até rompimento do controle hormonal de processos de desenvolvimento (GATEHOUSE, 2002). Essas defesas podem ser diretas, tornando a planta mais resistente à herbivoria, através da alteração da palatabilidade e aumento da toxicidade ou indireta, facilitando o controle das populações de herbívoros com o auxílio de patógenos, predadores ou parasitas. Metabólitos secundários vegetais também podem atrair muitos insetos favoráveis à dispersão de pólen e sementes (BAKKALI et al., 2008).

Além disso, os metabólitos secundários podem ser explorados pelos herbívoros adaptados, os quais têm desenvolvido vários mecanismos para sobreviver às defesas das plantas. Esses herbívoros podem (1) evitar as defesas da planta alimentando-se apenas das partes da planta que contêm quantidades mínimas dos metabólitos; (2) desenvolver mecanismos para estes aleloquímicos e permitir uma excreção mais rápida das toxinas; (3) destoxificar os metabólitos vegetais através de vias metabólicas ou com a ajuda de microrganismos endossimbióticos; (4) tolerar os metabólitos; (5) acumular, concentrar ou modificar esses metabólitos para o seu próprio benefício (OPITZ; MÜLLER, 2009). Neste último caso, os compostos secundários são captados e armazenados em partes específicas do corpo dos herbívoros. Essa captação, depósito e concentração desses metabólitos em tecidos ou células especializadas pelos insetos têm sido chamados de sequestro (DUFFEY, 1980).

A maioria dos insetos fitófagos é altamente especializada em poucas ou, até mesmo, em uma única espécie de planta hospedeira. Estas estreitas associações planta-inseto podem ser alcançadas, entre outras maneiras, através dos metabólitos

secundários da planta hospedeira e da habilidade dos herbívoros de se adaptar a vários tipos de compostos; por meio da distribuição biogeográfica das espécies de plantas e seus herbívoros associados; ou pela distribuição de parasitas e predadores associados às plantas (KIRK et al., 2012). Ehrlich e Raven (1964) observaram a especialização de insetos em famílias de plantas hospedeiras tropicais e propuseram a hipótese de que as plantas produzem metabólitos secundários, os quais, eventualmente, as tornam menos palatáveis aos insetos. Essa impalatabilidade forma uma zona adaptativa, porém alguns insetos fitófagos desenvolvem características que lhes auxiliam no acesso a essas plantas, formando uma nova zona adaptativa que permite a diversificação desses insetos. (ARNASON; BERNARDS, 2010). Assim, segundo Ehrlich e Raven (1964), por meio do processo de coevolução, os insetos são capazes de destoxificar determinadas substâncias de defesa que agem como deterrentes alimentares e, eventualmente, estas substâncias deterrentes se tornam atrativos alimentares. Portanto, essa hipótese ajuda a explicar as preferências alimentares relativamente restritas de muitos insetos (HARBORNE, 2001)

Os estudos realizados por Berenbaum (1983) permitiram a formulação da teoria conhecida como “corrida química armamentista”. De acordo com Berenbaum (1983), as relações entre plantas e seus insetos associados fazem com que as plantas produzam metabólitos secundários cada vez mais complexos, levando à diversificação destes indivíduos e ainda, sugerem que a coevolução difusa entre plantas e seus herbívoros tem sido cada vez mais frequente (ARNASON; BERNARDS, 2010). Entretanto, alguns estudos têm questionado a reciprocidade destas respostas seletivas e sugerem que enquanto as plantas exercem forte pressão seletiva sobre os insetos, raramente os insetos exercem forte pressão seletiva sobre as plantas (SCHOONHOVEN et al., 1998). Isto levou à hipótese da evolução sequencial, que propõe que os insetos estão meramente seguindo a evolução do metabolismo secundário das plantas sem afetá-las diretamente, ou seja, a diversificação de insetos fitófagos pode ser causada pelas plantas, mas a diversificação das plantas não é causada por seus insetos herbívoros (WAHLBERG, 2001).

É importante ressaltar, que as interações entre herbívoros especialistas e metabólitos secundários das plantas hospedeiras ainda são pouco compreendidas. Em alguns casos, a presença ou a ausência de classes de metabólitos tóxicos nas

plantas é conhecida por afetar o desempenho e a escolha da planta hospedeira em insetos especialistas. No entanto, poucas evidências sugerem que especialistas podem distinguir entre estruturas químicas estritamente relacionadas, ou que esses compostos diferem significativamente com relação aos efeitos sobre o desempenho e a escolha da planta hospedeira nos herbívoros especialistas (KIRK et al., 2012).

Por outro lado, a importância dos metabólitos secundários para a escolha de plantas hospedeiras tem sido estabelecida para diversos grupos de lepidópteros, que podem se alimentar de um grupo restrito de espécies de plantas. Em muitos casos, a especialização de espécies de borboletas a grupos de plantas leva as lagartas a utilizarem as defesas químicas das plantas na sua própria defesa. Frequentemente, a lagarta sequestra uma única classe de metabólito secundário, apesar de as plantas, no geral, apresentarem outras classes de metabólitos secundários (WAHLBERG, 2001).

Muitos insetos que sequestram compostos das plantas tornam-se impalatáveis aos predadores e demonstram sua proteção através de sinais de aviso que advertem a presença de substâncias no seu corpo (OPITZ; MÜLLER, 2009). Entre eles, as lepidópteros aposemáticas estão fortemente associadas às substâncias das plantas e sequestram essas toxinas ao invés de produzirem suas próprias toxinas ou utilizam-nas juntamente à produção das suas próprias toxinas (OPITZ; MÜLLER, 2009). Contudo, o sequestro não está necessariamente relacionado ao aposematismo, uma vez que a impalatabilidade dos insetos aposemáticos pode ocorrer devido às defesas químicas sintetizadas ou outros mecanismos de defesa.

Além de serem utilizados como defesa contra predadores, os metabólitos secundários também podem ser sequestrados para proteção contra raios ultravioletas, ação antimicrobiana, comunicação intra-específica e propósitos reprodutivos (NISHIDA, 2002). Neste último caso, os compostos das plantas podem ser metabolizados a feromônios sexuais.

1.2 *Chlosyne lacinia* e suas plantas hospedeiras

A tribo Melitaeini forma um grupo de aproximadamente 250 espécies de borboletas dentro da família Nymphalidae da ordem Lepidoptera. Essas espécies estão distribuídas na Europa, na Ásia, na América do Sul e na América do Norte (WAHLBERG, 2001). As borboletas melitaeines foram divididas em três grandes grupos. O primeiro apresenta as espécies pertencentes ao gênero *Euphydryas*, que se difere das demais melitaeines pela estrutura da genitália e por sua história de vida. O segundo é menos homogêneo e inclui as espécies pertencentes aos gêneros *Melitaea*, *Chlosyne* e outros gêneros menores. Já o terceiro corresponde às espécies do gênero *Phyciodes* (HIGGINS, 1981).

O gênero *Chlosyne* Butler é composto por cerca de 30 espécies (HIGGINS, 1981). A espécie *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae, Melitaeini) é caracterizada por borboletas de coloração preta, com asas anteriores de cor preta e laranja, e lagartas cobertas por cerdas, geralmente pretas, mas ambos os insetos podem apresentar variações polimórficas na coloração (GALLO et al., 2002) (Figura 1). Esta espécie ocorre do Arizona ao Texas, nos EUA, ao longo de toda a América Tropical, chegando à Argentina. As fêmeas desovam poucos (10 ou menos) e grandes grupamentos (entre 25 e 450 por grupo, com média de 140) de ovos amarelos (Figura 1). As massas de ovos são depositadas quase sempre na face adaxial das folhas, próximo à base da planta. No primeiro estágio (*instar*), as larvas são amarelo-claro e apresentam poucos espinhos ou cerdas. No segundo estágio, são pretas e apresentam espinhos rudimentares e, depois da muda para o terceiro estágio, as lagartas passam a ter espinhos ramificados e apresentam um dos três padrões de coloração larval: *nigra* (preta, com ou sem uma faixa médio-dorsal cinza), *bicolor* (preta, com uma faixa médio-dorsal amarela ou vermelha) ou *rufa* (vermelho-laranja sólido) (Figura 1) (CLARK; FAETH, 1997).

As lagartas de *C. lacinia* esqueletonizam as folhas da planta hospedeira durante os dois primeiros estágios, alimentando-se gregariamente em um grupo compacto, movendo-se de um local de alimentação a outro, também em grupo. No fim do segundo estágio e durante o terceiro, as larvas continuam a se alimentar gregariamente, mas nessa fase na mais exposta face adaxial das folhas, consumindo toda a folha. Durante o quarto estágio os grupos de lagartas dividem-se em grupos menores, que consomem folhas inteiras, frequentemente desfolhando a planta hospedeira, e migram para plantas hospedeiras próximas. As lagartas, no quinto e último estágio, são solitárias, tendem a alimentar-se pouco e diminuem de

tamanho antes de entrar no estágio de pupa, que ocorre na planta hospedeira ou próximo a ela (CLARK; FAETH, 1997).

Há várias hipóteses capazes de explicar a ocorrência de grupos de ovos e o agregamento larval. Entre elas, pode-se citar: aumento da fecundidade da fêmea; limitações energéticas nas fêmeas adultas; prevenção da dessecação dos ovos; resposta à distribuição de plantas hospedeiras; variação no metabolismo secundário e nutricional das plantas hospedeiras; e aumento da eficiência alimentar das lagartas. Esses benefícios podem ser reforçados pelo aumento da sobrevivência larval causado pela coloração conspícua e repugnância, as quais levam à proteção contra inimigos naturais (CLARK; FAETH, 1997; SILLÉN-TULLBERG; BRYANT, 1983; STAMP, 1980). De fato, mesmo apesar da presença de pássaros e lagartos nos locais onde as lagartas de *C. lacinia* foram observadas, não há relatos do uso de qualquer estágio da vida de *C. lacinia* para propósitos de alimentação de predadores (CLARK; FAETH, 1997). Aparentemente, *C. lacinia* é uma espécie aposemática, ou que mimetiza um aposematismo, e anuncia a sua possível natureza repugnante por meio de suas cores (WAHLBERG, 2001).

A informação sobre a utilização de plantas hospedeiras é uma base importante a partir da qual estudos ecológicos podem emergir. *C. lacinia* é uma espécie oligófaga que utiliza quase exclusivamente espécies da família Asteraceae como plantas hospedeiras. Dezesesseis plantas hospedeiras foram reportadas para as lagartas desta espécie na América do Norte, todas pertencentes à família Asteraceae, majoritariamente à tribo Heliantheae, sendo a mais importante e frequente o girassol (*Helianthus annuus*, Asteraceae: Heliantheae) (RAYMOND, 1973). Seu conjunto de hospedeiras no Brasil inclui cerca de 17 espécies vegetais, das quais 15 pertencem à família Asteraceae (*Acanthospermum hispidum* DC, *Ambrosina polystachia* DC, *Bidens pilosa* L., *Emilia sonchifolia* DC, *Galinsoga parviflora* Cav., *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* L., *Parthenium hyterophorus* L., *Senecio brasiliensis* Less, *Sonchus oleraceus* L., *Vernonia* sp., *Wedelia glauca* DC, *Wedelia paludosa* DC, *Xanthium cavanillesii* Schouw e *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray); uma à família Fabaceae (soja, *Glycine max* (L.) Merrill); e uma à família Rubiaceae (*Richardia brasiliensis* Gomez) (JUSTUS et al., 2003; LOURENÇÃO; UNGARO, 1983; AMBRÓSIO et al., 2008).

No Brasil, onde é conhecida como lagarta-do-girassol, a lagarta de *C. lacinia* é o inseto mais abundante nas culturas desta Asteraceae, podendo assumir

importância econômica por provocar intensos desfolhamentos, deixando apenas as nervuras das folhas das plantas atacadas (JUSTUS et al., 2003; LOURENÇÃO; UNGARO, 1983). Um dos aspectos importantes na tentativa de controle desses insetos é o conhecimento dos hospedeiros alternativos, que permitem a continuidade do ciclo de vida do inseto (JUSTUS et al., 2003).

Lactonas sesquiterpênicas (LST) são metabólitos secundários característicos de espécies da família Asteraceae, usualmente armazenados no interior de tricomas glandulares capitados de folhas e flores (SPRING, 1989). São conhecidas devido às suas propriedades antiinflamatória, tóxica e deterrente alimentar para herbívoros (DUTTA et al., 1986, 1993; PASSREITER; ISMAN, 1997; PICMAN, 1986; SCHMIDT, 1999; SIEDLE et al., 2004). Em algumas espécies de lepidópteras, certas LST podem reduzir a taxa de crescimento, aumentar o número de dias de pupa, reduzir o peso da pupa e diminuir a taxa de sobrevivência (PICMAN, 1986). Assim, além das atividades biológicas, tem sido demonstrado que as LST desempenham também um papel ecológico altamente importante, como por exemplo, na defesa da planta que as produz contra insetos herbívoros. Esta hipótese é reforçada através de estudos que demonstram um aumento significativo nos níveis desses metabólitos nas folhas de algumas espécies vegetais submetidas a injúrias mecânicas, por processos alelopáticos (redução da taxa de germinação e do crescimento de alguns vegetais), pela capacidade de atuar como substâncias deterrentes (desestimulantes alimentares ou fagoinibidores) para alguns mamíferos e insetos, bem como pela diminuição da taxa de sobrevivência e reprodutibilidade em diferentes tipos de larvas de borboletas e de besouros (PASSREITER; ISMAN, 1997; PICMAN, 1986).

As LST isoladas de *T. diversifolia* apresentam atividade deterrente contra algumas lepidópteras e localizam-se principalmente em tricomas glandulares na face adaxial das folhas (AMBRÓSIO et al., 2008; DUTTA et al., 1986, 1993). Independentemente da deterrência das LST presentes nas folhas de *T. diversifolia*, as lagartas de *C. lacinia* aparentemente utilizam essa espécie como hospedeira preferencial na região de Ribeirão Preto e ingerem altas quantidades de LST e demais metabólitos das folhas dessa planta. Isso mostra que a lagarta de *C. lacinia*, de algum modo, é capaz de lidar com os altos teores de LST presentes nas folhas de *T. diversifolia*. Observações preliminares mostraram que *C. lacinia* capturada em seu terceiro estágio de desenvolvimento em *T. diversifolia* não se alimenta de folhas de *V. polyanthes*, morrendo em alguns dias por inanição. Contudo, a alimentação e

a preferência por outras espécies, às vezes, pode ser induzida se iniciada no

Figura 1 - Ciclo de vida de *C. lacinia* (fotos: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto)
primeiro estágio das lagartas (TING et al., 2002).

1.3 *Vernonia polyanthes* Less e *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

A família Asteraceae é considerada o segundo grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, representando cerca de 10% da flora mundial. Apresenta plantas de hábito extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (BREMER, 1994). Esta família caracteriza-se quimicamente pela elevada capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, principalmente, terpenoides flavonoides, cumarinas e poliacetilenos (ZDERO; BOHLMANN, 1990).

Vernonia é um dos maiores gêneros de Asteraceae, com cerca de mil espécies, compreende espécies arbustivas, arbóreas, herbáceas perenes e anuais, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (BREMER, 1994; JONES, 1982; LEITÃO FILHO et al., 1972; ROBINSON, 1999). O gênero *Vernonia* se caracteriza quimicamente pela presença de flavonoides e LST, e pela ausência de diterpenos e alcaloides, havendo também relatos de cumarinas e sesquiterpenos em algumas espécies (BOHLMANN et al., 1981, 1983; BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990; MABRY et al., 1975). Observa-se uma nítida predominância de LST com esqueletos da classe dos germacranolidos, especialmente aquelas sem o grupamento 11,13-exo-metilênico, como os glaucolidos e hirsutinolidos (BOHLMANN; JAKUPOVIC, 1990; HERZ, 1996), havendo também alguns relatos de ocorrência de LST do tipo guaianolido (LOPES, 1980; SEAMAN, 1982), cadinanolido (BAZON et al., 1997) e vernolidos (ERASTO et al., 2006; JAKUPOVIC et al., 1985).

Vernonia polyanthes Less (Figura 2) é popularmente conhecida como assa-peixe, tramanhém, mata-pasto, erva-preá e cambará. É uma planta silvestre, muito comum nos cerrados de Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais e Goiás, multiplica-se com facilidade em pastagens, em solos pouco férteis, nas beiras de estradas, sendo considerada planta daninha de culturas perenes e pastagens (ALVES; NEVES, 2003). Também é considerada melífera, sendo intensamente procurada por abelhas, tanto pelo néctar como pelo pólen. As folhas de *V. polyanthes* são utilizadas no tratamento de afecções do aparelho respiratório, de problemas renais, de feridas e em torções, contusões e luxações (GRANDE et al., 1989). Do ponto de vista fitoquímico, foram isolados das partes aéreas de *V. polyanthes* três LST do tipo hirsutinolido, além do fitoesteróide estigmasterol, do triterpeno acetato de lupeíla, dos sesquiterpenos germacreno-D, biciclo-germacreno e α -humuleno, do poliacetileno tridecapentaineno e desidrovernopolanthofurano (BOHLMANN et al., 1981, 1983).

O gênero *Tithonia*, pertencente à tribo Heliantheae (Asteraceae), compreende cerca de 11 espécies (BREMER, 1994; PEREIRA et al., 1997). Possui como metabólitos secundários característicos LST do tipo furanoeliangolido, heliangolido e germacranolido (PÉREZ et al., 1998, 1992). O gênero possui espécies anuais e perenes e algumas espécies, como *T. diversifolia* e *T. rotundifolia*, são ornamentais (LA DUCKE, 1982).

A espécie *Tithonia diversifolia* (Figura 2) é um arbusto nativo da América Central que foi introduzida no Brasil, sendo considerada planta invasora, bastante presente no estado de São Paulo (GOFFIN et al., 2002). Tem sido utilizada como planta medicinal em

alguns países, incluindo o Brasil, evidenciando-se suas ações antiinflamatória (OWOYELE et al., 2004), antimalárica (ELUFIOYE; AGBEDAHUNSI, 2004) e no tratamento do diabetes (MIURA et al., 2005). É conhecida popularmente como margaridão ou girassol-mexicano. A atividade antiinflamatória *in vitro* das três principais LST isoladas desta espécie frente ao mediador central da inflamação NF- κ B foi descrita (RÜNGELER et al., 1998). Foram isoladas de extratos das partes aéreas de *T. diversifolia* várias LST com esqueleto tipo heliangolido, sendo aparentemente majoritárias as LST tagitinina C, tagitinina A e tagitinina F, além de algumas LST com esqueleto tipo guaianolido, o diterpeno ácido caurenico e o flavonoide hispidulina (AMBRÓSIO et al., 2008). No entanto, em estudo recente de desreplicação por CLAE-UV-EM de diversos extratos das folhas desta espécie, a única LST identificada foi a tagitinina C. Além dela, neste estudo foram identificados nos extratos as flavonas hispidulina, nepetina e luteolina, ácidos clorogênicos e o ácido protocatecuico (GOBBO-NETO et al., 2009).

Figura 2: *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* (fotos: Maria Elvira Poleti Martucci e Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto)

1.4 Análises metabolômicas

As elucidações do genoma, proteoma e transcriptoma são baseadas em análises químicas direcionadas a biopolímeros compostos por quatro diferentes nucleotídeos (genoma e transcriptoma) ou 22 aminoácidos (proteoma). Esses compostos são altamente semelhantes quimicamente, facilitando as análises analíticas. Entretanto, dentro de metaboloma há uma grande variedade de propriedades e estruturas químicas (VILLAS-BÔAS et al., 2005). As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários, os quais têm apresentado funções de defesa contra herbivoria. Estima-se que o reino vegetal produza de 100.000 a 200.000 metabólitos secundários, dos quais apenas cerca de 10% foram identificados, portanto as plantas representam um grande desafio em metabolômica (ALLWOOD et al., 2009; JANSEN et al., 2009)

Dessa forma, metaboloma consiste de compostos químicos extremamente diversos e produtos naturais complexos. Esta complexidade torna praticamente impossível a determinação simultânea do metaboloma completo (VILLAS-BÔAS et al., 2005). Entretanto, o metaboloma de plantas tem sido estudado por meio de preparo de amostras e extrações eficientes, em conjunto com diferentes técnicas analíticas, e compreendendo diferentes etapas; sendo as mais importantes no presente projeto: (1) obtenção das impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprinting*), que visa determinar diferenças metabólicas entre as amostras. Os metabólitos não são identificados nesta etapa, mas a comparação entre as amostras gera subsídios para determinar qual metabólito ou grupo de metabólitos são diferentes entre as amostras; e, (2) com base nos resultados da primeira etapa, pode-se partir para a obtenção de perfis metabólicos (*metabolite profiling*), que visa à identificação e à quantificação, quando necessário, do grupo de metabólitos responsáveis pelas diferenças observadas nas impressões digitais (ALLWOOD et al., 2009; BAMBA; FUKUSAKI, 2006; JANSEN et al., 2009; MORITZ; JOHANSSON, 2008; NORDSTRÖM, 2008).

Atualmente, não há nenhuma técnica analítica ou uma combinação de técnicas capazes de detectar todos os metabólitos em uma dada amostra biológica. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tem sido apropriada para a detecção de uma grande variedade de classes de

metabólitos e uma das vantagens é não precisar submeter a amostra ao processo de derivatização. Também é importante ressaltar, que grande parte dos metabólitos secundários são semi-polares e estes são melhor separados por CLAE-EM (ALLWOOD et al., 2009).

Nos estudos metabolômicos, a identificação dos metabólitos é preferencialmente realizada por meio da desreplicação. Os espectros no UV e de massas dos picos cromatográficos obtidos nas análises são comparados com compostos que já foram relatados na literatura e constam em bancos de dados, como o SciFinder ou PubChem, identificando portanto, os constituintes de cada amostra analisada sem necessidade de seu isolamento (CROTTI et al., 2006; GOBBO-NETO e LOPES, 2008; HOSTETTMANN et al., 2001). Somente os metabólitos de interesse não identificados pela desreplicação precisam ser isolados para identificação estrutural.

Apesar das vantagens do uso de CLAE-UV-EM, ela ainda não tem sido muito utilizada em estudos ecoquímicos, nos quais a baixa biomassa final de insetos utilizados e a baixa concentração de metabólitos ativos dificultam o isolamento de metabólitos. Portanto é importante a identificação diretamente no extrato por uma técnica analítica sensível e eficaz. Assim, a análise metabolômica por CLAE-UV-EM é uma ferramenta poderosa quando se tem em vista a compreensão da ecologia química de interações planta-inseto (JANSEN et al., 2009).

2. Objetivos

Os objetivos gerais deste trabalho foram investigar se os metabólitos secundários das Asteraceae *V. polyanthes* e *T. diversifolia* são metabolizados, excretados intactos e/ou sequestrados durante a fase larval de *C. lacinia*, e se são conservados pelo adulto.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Cultivar lagartas de *C. lacinia*, obtidas a partir da eclosão dos ovos coletados em campo, para a obtenção de lagartas nos diferentes estágios larvais e adultos.
- b) Alimentar as lagartas obtidas em laboratório com folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia*, a partir do primeiro estágio até a fase adulta, avaliando, assim o desenvolvimento das mesmas.
- c) Obter e comparar os perfis metabólicos em CLAE-UV-EM de lagartas totais, fezes das lagartas, hemolinfa das lagartas, corpo e asa dos insetos adultos de *C. lacinia* e de extrato de folhas de *T. diversifolia* e *V. polyanthes*.
- d) Analisar os perfis metabólicos, obtidos por CLAE-UV-EM, dos extratos das lagartas totais; das fezes; da hemolinfa; das asas e do corpo de *C. lacinia*, visando identificar metabólitos secundários inalterados ou metabolizados das folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia*.
- e) Analisar se os metabólitos secundários das folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia* são acumulados no corpo do inseto adulto e se são excretados sob a forma inalterada, metabolizados ou acumulados pelas lagartas de *C. lacinia*.

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos para análises por CLAE-UV-EM

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-20A, Shimadzu) acoplado a um detector de UV com arranjo de diodos (UV-DAD) (CBM20A, Shimadzu) e a um espectrômetro de massas (MicroTOFq, Bruker Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo tempo de voo (TOF). Foram utilizadas duas colunas Onix Monolithic C 18 (100/3 mm; Phenomenex), em série e acopladas a uma pré-coluna de material equivalente.

3.2 Obtenção de *C. lacinia*

3.2.1 Coleta em campo

Os grupamentos de ovos depositados pelas borboletas *C. lacinia* foram coletados em campo, com auxílio de uma espátula, em folhas de *T. diversifolia* e *Tridax procumbens* Linn no mês de fevereiro de 2011.

3.2.2 Cultivo em laboratório

O cultivo de *C. lacinia* foi baseado naquele descrito por Drummond III et al., (1970). Assim, *C. lacinia* foi cultivada em laboratório a partir dos grupamentos de ovos coletados em campo e esse cultivo foi conduzido com controle de fotoperíodo (16h dia x 8h noite) e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2.2.1 Cultivo da fase larval

Para cultivo em laboratório, os grupamentos de ovos foram colocados para eclodir na face abaxial de folhas de *T. diversifolia* e *V. polyanthes*, separadamente. As folhas com os ovos foram acondicionadas em placas de Petri, obedecendo à quantidade de uma folha com um grupamento de ovos por placa, e tiveram sua umidade e turgor mantidos através do envolvimento dos pecíolos por algodão hidrofílico umedecido, imediatamente após a folha ser cortada da planta.

Após eclosão das larvas e início da alimentação, as folhas destinadas à alimentação das larvas foram repostas conforme a necessidade e o crescimento das lagartas. Até o segundo estágio, as lagartas foram mantidas nas placas de Petri. Após mudança para o terceiro estágio, as lagartas foram transferidas para caixas de plástico transparente (60cm largura x 40cm profundidade x 40cm altura). Folhas frescas das plantas foram, então, adicionadas diariamente, e os detritos, removidos. Foram usadas 60 lagartas em cada replicata e estas foram tratadas até a pupação.

3.2.2.2 Cultivo da fase adulta

As pupas formadas a partir das lagartas em cada uma das caixas de cultivo foram mantidas nestas até completar a metamorfose, e as lagartas restantes foram transferidas para outras caixas, a fim de que completassem a pupação sem afetar as pupas já formadas. A tampa das caixas plásticas contendo as pupas foi substituída por tule para aeração adequada do sistema até se completar a metamorfose.

Para alimentação dos adultos, utilizou-se uma solução de mel em água (1:10), acondicionada em frascos de vidro estéreis contendo roletes de algodão hidrofílico imersos na solução com uma extremidade exteriorizada ao frasco.

3.3 Avaliação da performance de *C. lacinia*

A performance de *C. lacinia*, nas duas plantas em estudo, foi avaliada por meio das taxas de crescimento e de mortalidade das lagartas, em estágios larvais equivalentes, em cada uma das triplicatas tratadas com folhas de *T. diversifolia* ou com folhas de *V. polyanthes*. A taxa de mortalidade foi obtida pelo número de lagartas que morreram durante os tratamentos com as plantas em estudo e foi mostrada em porcentagem. A taxa de crescimento das lagartas foi obtida pelo peso médio das lagartas ($n = 10$) em cada um dos estágios de seu desenvolvimento nas triplicatas dos dois tratamentos. Para avaliar a significância estatística da diferença da taxa de crescimento entre os dois tratamentos, foi utilizado test-T no software SPSS (Chicago, Estados Unidos).

3.4 Obtenção de amostras para análise

3.4.1 Amostras vegetais

Extratos das folhas das plantas hospedeiras (*T. diversifolia* e *V. polyanthes*) foram realizados a partir de material coletado das plantas cultivadas ao redor dos laboratórios do NPPNS da FCFRP. Para isso, algumas folhas saudáveis e completamente desenvolvidas foram coletadas, imediatamente congeladas em freezer a -15°C e liofilizadas para posterior extração com $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 1:1, conforme descrito abaixo (item 3.5).

3.4.2 Amostras de *C. lacinia*

As lagartas submetidas a cada um dos tratamentos (alimentação com *V. polyanthes* ou *T. diversifolia*) foram amostradas ($n = 10$), separadamente de cada

uma das caixas de cultivo, do segundo ao quarto estágio larval. Estas lagartas foram pesadas, privadas de alimentação por 24 horas e então congeladas e mantidas em freezer -15°C para análise posterior (item 3.5). Antes da extração, as lagartas tiveram seus órgãos internos retirados com auxílio de bisturi sob estereomicroscópio. As fezes produzidas pelas lagartas no segundo, no terceiro e no quarto estágios, foram coletadas com o auxílio de uma espátula, armazenadas em tubo de microcentrífuga e então congeladas e mantidas em freezer até o momento da análise (item 3.5).

Alguns microlitros da hemolinfa das lagartas no quarto estágio foram coletados para análise metabólica, visando verificar a existência, ou não, de metabólitos das plantas hospedeiras (intactos ou metabolizados) na hemolinfa. Para isso, lagartas no quarto estágio foram imersas em banho de gelo por 15 minutos e suas pernas medianas cortadas com bisturi, sob estereomicroscópio. A hemolinfa foi coletada em tubos de microcentrífuga e imediatamente congelada em freezer para análise posterior.

Para a obtenção de extratos de *C. lacinia* na fase adulta, logo após a metamorfose, algumas borboletas foram retiradas da caixa de alimentação, congeladas em freezer e, então, divididas em asas e corpo. Cada parte foi triturada separadamente e submetida à extração (item 3.5) para análise posterior.

Os extratos dos diferentes estágios larvais, fezes, hemolinfa e borboletas foram obtidos em triplicata para cada uma das dietas (*T. diversifolia* e *V. polyanthes*), sendo que os extratos das lagartas e das borboletas foram feitos a partir de um pool de indivíduos.

3.5 Preparo dos extratos para análise por CLAE-UV-EM

As amostras animais e vegetais, previamente congeladas, foram liofilizadas durante 24 horas a fim de eliminar a água presente nas amostras. Em seguida, esse material foi triturado em N₂ líquido. Por último, os extratos para análise por CLAE-UV-EM foram preparados pela extração de 5,0mg de amostra, em 100µL de uma solução de MeOH-H₂O 1:1. Previamente à injeção no equipamento, os extratos preparados foram filtrados em membrana filtrante de PTFE (0,22µm).

3.6 Análises por CLAE-UV-EM

Para a análise dos extratos, foi injetada uma alíquota de 10 μ L no cromatógrafo, via injetor automático, utilizando fluxo de 1,4mL/min e como fase móvel H₂O/ HAc 1% na bomba A e MeCN/HAc 1% na bomba B, no gradiente de eluição: 0,01min (0% B); 86min (64,5% B); 89min (100% B); 91min (100% B); 93 min (0% B). O eluente foi dividido por um *splitter* em uma proporção de 3:1, sendo o fluxo maior direcionado ao DAD e o restante ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas no UV foram registrados nos comprimentos de onda: 230, 270 e 325nm.

Os parâmetros do espectrômetro de massas, listados a seguir, foram os mesmos para todas as análises: 1000 scans por segundo; intervalo de 2 segundos entre espectros; fluxo de gás de secagem de 6,0mL/min; temperatura de 250°C do gás de secagem e pressão do gás de nebulização de 4,5bar. Por fim, os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre *m/z* 50 e *m/z* 1200.

3.7 Identificação dos picos cromatográficos

Inicialmente, a identificação dos picos cromatográficos, presentes nos extratos das folhas de *T. diversifolia* e de *V. polyanthes*, foi realizada com base na comparação das informações fornecidas pelos espectros no UV e de massas, obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM, com as informações presentes no banco de dados formado por espectros de massas e no UV de substâncias previamente identificadas por CLAE-UV-EM. Em alguns casos, a identificação ocorreu também por meio da comparação dos espectros no UV e de massas de cada pico cromatográfico com dados da literatura de estudos realizados com plantas destas espécies ou destes gêneros.

Por outro lado, a identificação dos sinais cromatográficos, presentes nos extratos das amostras (lagartas, fezes, hemolinfa, corpo e asa de borboletas) provenientes de *C. lacinia*, foi feita por meio da comparação dos espectros no UV e

de massas desses picos com os espectros de massas e no UV previamente obtidos para as folhas de *T. diversifolia* e de *V. polyanthes*. Além disso, a identificação desses picos cromatográficos também foi baseada nos principais mecanismos de destoxificação utilizados por Lepidoptera, os quais se dividem em fase I e fase II. Na fase I, as enzimas, principalmente as monooxigenases P450, inserem grupos polares e reativos por meio da oxidação, hidrólise e redução para posterior excreção enquanto que na fase II, os metabólitos ativados na fase I são conjugados com glicose, sulfato, glutathione, glucuronato ou fosfato (HARBORNE, 1993; SCHOONHOVEN et al., 2005 CHAHINE e O'DONNELL, 2011).

4. Resultados e Discussão

4.1 Identificação dos picos cromatográficos presentes no extrato das folhas de *T. diversifolia* e no extrato das folhas de *V. polyanthes*.

As análises realizadas por CLAE-UV-EM mostraram que os metabólitos secundários encontrados nos extratos das folhas de *T. diversifolia* e de *V. polyanthes* são pertencentes às classes dos ácidos clorogênicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. Ao observar os cromatogramas apresentados na Figura 3 é possível identificar a presença de 22 picos cromatográficos identificados na Tabela 1. As estruturas químicas dos ácidos clorogênicos e dos flavonoides estão representadas na Figura 4 e as estruturas químicas das LST estão representadas na Figura 5. Os espectros de massas e os espectros no UV de cada uma das substâncias identificadas estão apresentados nas Figuras 11 a 32 do Apêndice A.

4.1.1 Ácidos Clorogênicos

Os ácidos clorogênicos foram identificados por meio da comparação dos dados obtidos pelas análises em CLAE-UV-EM no modo de ionização negativo com as informações presentes no banco de dados, como tempo de retenção e íons fragmentos, além da utilização das chaves para identificação de ácidos clorogênicos publicadas por Clifford et al. (2003, 2005).

Os picos cromatográficos 1, 2 e 3 apresentaram espectros no UV com absorção máxima em ≈ 300 e $\approx 330\text{nm}$, o que é característico de substâncias, cujo cromóforo principal é uma unidade de ácido cafeico. Os três picos apresentaram o íon m/z 353 $[M - H]^-$, e, por isso, foram identificados como ácidos cafeoilquínicos. A diferença entre eles está no padrão de fragmentação deste íon. Os picos 1 e 3 também apresentaram o íon m/z 191 $[(M - H) - 162]^-$, formado após a perda de uma unidade cafeoil. Já o pico 2 apresentou o íon m/z 173, originado a partir da

desidratação do ácido quínico e característico de ácido clorogênico formado por uma unidade de ácido cinâmico esterificada na posição 4 do ácido quínico.

A diferença no padrão de fragmentação é explicada pelo fato de que nos derivados 4-acil não há proximidade espacial entre o ácido cafeico ou outro ácido *trans*-cinâmico esterificado com o ácido quínico, e a carboxila ou hidroxila no carbono 1. Como a eliminação da porção cafeica é determinada pela sua proximidade com a carboxila ou com a hidroxila na posição 1, nestes derivados é necessária uma eliminação de água a partir de uma das hidroxilas presentes nas posições 3 ou 5 do ácido quínico antes da eliminação do ácido cafeico. Por outro lado, nos derivados 5-acil, um H da carboxila do ácido quínico é abstraído para eliminação do ácido cafeico, enquanto que nos derivados 3-acil ocorre abstração de um H da hidroxila.

Dessa forma, o pico 2 foi identificado como ácido-4-*O-E*-cafeoilquínico (4-CQA), enquanto que os picos 1 e 3 foram identificados como ácido-3-*O-E*-cafeoilquínico (3-CQA) e ácido-5-*O-E*-cafeoilquínico (5-CQA), respectivamente. A diferenciação entre estes dois isômeros (picos 1 e 3) foi possível por meio do conhecimento prévio de que o 3-CQA elui antes do 5-CQA e por meio da comparação dos dados obtidos para cada pico com as informações descritas para estes compostos no banco de dados. Assim, o ácido-3-*O-E*-cafeoilquínico (3-CQA) foi atribuído ao pico 1 e o ácido-5-*O-E*-cafeoilquínico (5-CQA) ao pico 3 (CLIFFORD et al., 2003; GOBBO-NETO e LOPES, 2008).

O pico 4 foi identificado como ácido-4-*O-E*-feruloilquínico, uma vez que apresentou o íon m/z 367 $[M + H]^+$ no modo de ionização negativa, o qual apresentou o íon fragmento m/z 173 $[(M - AQ) - H_2O]^-$, característico de ácidos clorogênicos esterificados na posição 4 do ácido quínico, já que, como dito anteriormente, os derivados 4-acil precisam sofrer uma desidratação antes da eliminação do ácido *trans*-cinâmico.

O pico 6 foi identificado por meio dos dados fornecidos pelo banco de dados como sendo mono-*O*-cafeoilxose. Esse composto apresentou no seu espectro de massas, obtido no modo de ionização positivo, os íons m/z 335 $[M + Na]^+$, m/z 313 $[M + H]^+$ e m/z 163 $[(M + H) - 162]^+$ como pico base, sendo este último formado pela perda de uma unidade cafeoil, enquanto que no modo de ionização negativo, foram observados os íons m/z 623 $[dímero - H]^-$ e m/z 311 $[M - H]^-$. Cabe ainda ressaltar, que o espectro no UV deste pico com máximo de absorção em ≈ 295 e ≈ 328 nm também corresponde à absorção típica de unidades cafeicas

Os picos 8 e 11, correspondentes aos ácidos di-*O-E*-cafeoilquínicos, foram identificados a partir do íon m/z 515 e em seguida, diferenciados entre si por meio dos padrões de fragmentação. Além disso, a ordem de eluição previamente relatada em outros estudos, na qual o 1,3-di-CQA elui antes do 1,5-di-CQA, também foi usada na identificação e consequentemente na diferenciação desses compostos. Todos os três ácidos 1-acil di-CQA apresentaram o íon molecular esperado em m/z 515 e o íon m/z 353 [diCQA – ácido cinâmico – H]⁺ formado a partir da fragmentação do anterior. De acordo com relatos anteriores, os compostos 1,3-di-CQA e 1,5-di-CQA também apresentam o íon m/z 191, no modo de ionização negativo, enquanto que, o composto 1,4-di-CQA apresenta o íon m/z 173 (CLIFFORD et al., 2003, 2005).

Dessa maneira, o ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico foi atribuído ao pico 8. No modo de ionização positivo, esse composto apresentou os íons m/z 517 [M + H]⁺ e m/z 499 [(M + H) – 18]⁺, formado a partir da desidratação do ácido di-cafeoilquínico, enquanto que, no modo de ionização negativo, foram observados os íons m/z 515 [M – H][–] como pico base, m/z 353, e m/z 173, que, como já dito anteriormente, é característico de acilação na posição 4. O pico 11 foi identificado como ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, uma vez que apresentou os mesmos íons do pico 8, portanto, a diferença entre eles foi determinada pela ordem de eluição, sendo que o pico 8 eluiu antes do pico 11. Além disso, o espectro no UV com absorção máxima em ≈ 300 e ≈ 330 nm e as informações observadas no banco de dados permitiram a confirmação da identidade desses picos (CLIFFORD et al., 2003, 2005).

Ainda entre os ácidos diacilclorogênicos, o extrato das folhas de *T. diversifolia* apresentou também o ácido-4,5-*O-E*-feruloilcafeoilquínico, caracterizado pela absorção máxima no espectro no UV em ≈ 299 e ≈ 326 nm e pelos íons m/z 529 [M – H][–], m/z 367 [FQA – H][–], originado a partir da eliminação da unidade cafeica e m/z 173, íon específico de esterificação na posição 4 do ácido quínico. Esse composto foi atribuído ao pico 5.

4.1.2 Flavonoides

Os flavonoides foram identificados com base no espectro no UV, nos padrões de fragmentação observados nos espectros de massas, tanto no modo de ionização

negativo quanto no positivo e principalmente, pela comparação destas informações com os dados obtidos em outro estudo previamente realizado com plantas do gênero *Vernonia*. Também foram usados dados presentes na literatura sobre flavonoides identificados nestas espécies (*V. polyanthes* e *T. diversifolia*) ou nestes gêneros (*Vernonia* e *Tithonia*). Assim, foram identificados os seguintes flavonoides: luteolina-7-*O*-glicuronil, apigenina-7-*O*-glicuronil, crisoeriol-7-*O*-glicuronil e acacetina-7-*O*-glicuronil.

O pico 7 apresentou espectro no UV semelhante ao esperado para a flavona luteolina, com absorção máxima em 253 e 345nm e um ombro com absorção máxima em 267nm, indicando uma provável substituição na posição 7. O espectro de massas, obtido no modo de ionização negativo, demonstrou a presença do íon m/z 461 $[(M - H)]^-$ e do seu fragmento m/z 285 $[(M - H) - 176]^-$, originado após a perda de glicuronil. Desse modo, foi possível identificar esse pico como luteolina-7-*O*-glicuronil, uma vez que, foi observada a perda de 176u, valor que corresponde à massa de glicuronil (MARKHAM, 1982; NAGY et al., 2011; PUKALSKAS et al., 2012). Luteolina-7-*O*-glicuronil já foi identificada em folhas de *Vernonia amygdalina* L (SALAWU et al., 2009; SALAWU et al., 2011; JOHNSON et al., 2011).

O pico 9 foi identificado como apigenina-7-*O*-glicuronil, uma vez que, espectro no UV com absorção máxima em 266 e 335nm permitiu inferir sobre a presença de apigenina. Assim, juntamente com os dados fornecido pelos espectros de massas, que apresentaram os íons m/z 445 $[M - H]^-$ e m/z 269 $[(M - H) - 176]^-$, no modo de ionização negativo, e os íons m/z 447 $[M + H]^+$ e m/z 271 $[(M + H) - 176]^+$, no modo de ionização positivo, foi possível atribuir a flavona apigenina-7-*O*-glicuronil ao pico 7 (MARKHAM, 1982; SUROWIEC et al., 2007; PETROVICIU et al., 2010). Apigenina *O*-glicuronil já foi identificada em folhas de *Vernonia amygdalina* L (JOHNSON et al., 2011) e apigenina 6-*O*-glicuronil ou apigenina-7-*O*-glicuronil também foi encontrada em folhas desta mesma planta (SALAWU et al., 2009).

O pico 10 foi identificado como crisoeriol-7-*O*-glicuronil, uma vez que apresentou absorção máxima no UV em 270 e 345nm e um ombro com absorção máxima em 250nm, o que está em consonância com a flavona crisoeriol. Além disso, o espectro de massas no modo de ionização positivo demonstrou a presença dos íons m/z 477 $[M + H]^+$ como pico base e m/z 301 $[(M + H) - 176]^+$, correspondente à aglicona livre da unidade glicuronil, enquanto que o espectro de massas no modo de ionização negativo apresentou o íon m/z 475 $[M - H]^-$. Esses dados, em conjunto ao

conhecimento prévio sobre a composição química das folhas de *V. polyanthes*, permitiram a atribuição desta flavona ao pico 10 (MARKHAM, 1982; EL-HELA et al., 2010).

O pico 15 foi atribuído à acacetina-7-*O*-glicuronil, uma vez que o espectro no UV com absorção máxima em 265 e 330nm é característico para acacetina (MARKHAM, 1982). Ainda, os espectros de massas apresentaram os íons m/z 461 $[M + H]^+$ e m/z 285 $[(M + H) - 176]^+$ e os íons m/z 459 $[M - H]^-$ e m/z 283 $[(M - H) - 176]^-$, nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente (SHI et al., 2010), permitindo a identificação deste pico como acacetina-7-*O*-glicuronil.

O pico 22 apresentou íons em m/z 315 $[M + H]^+$ e em m/z 313 $[M - H]^-$. Na análise por CLAE-UV-EM no modo negativo foi observada a presença do íon em m/z 283 $[(M - H) - 30]^-$, referente à eliminação de dois grupos metila, o que possivelmente indica uma dimetoxiluteolina. Além disso, o espectro de UV mostrou absorção máxima em 262 e 333nm, característica de 3',4'-dimetoxiflavona. Assim, o pico 22 foi identificado como 3',4',-dimetoxiluteolina (MABRY et al., 1970; HARTWIG et al., 1990; KUWABARA et al., 2003).

4.1.3 Lactonas sesquiterpênicas

As LST foram identificadas, principalmente por meio da comparação dos dados de UV e de espectrometria de massas obtidos durante as análises por CLAE-UV-EM com as informações presentes no banco de dados, e em alguns casos, com os dados presentes na literatura das LST previamente identificadas em *T. diversifolia* e em *V. polyanthes*, ou em outras plantas desses gêneros.

O pico 12 foi identificado como provável 4 β ,10 α -diidroxí-3-oxo-8 β -isobutirolóxiguaia-11(13)-en-6,12-olido, por meio da comparação dos dados obtidos nas análises por CLAE-UV-EM com dados da literatura (ZDERO et al., 1987) e pela fórmula molecular $C_{19}H_{26}O_7$ determinada para o íon m/z 367 $[M + H]^+$ (calculada para m/z 367,1741 $[M + H]^+$, $C_{19}H_{27}O_7$ e erro 2,9ppm) No modo de ionização positivo, esta LST apresentou o íon m/z 367 $[M + H]^+$ e os fragmentos m/z 349 $[(M + H) - 18]^+$, formado após a desidratação; m/z 279 $[(M + H) - OiBu]^+$ e m/z 261 $[(279) - 18]^+$, formado pela desidratação do íon m/z 279 (ZDERO et al., 1987; KURODA et al., 2007).

A tagitinina A foi atribuída ao pico 13, uma vez que esse pico cromatográfico apresentou padrão de fragmentação no espectro de massas correspondente ao esperado para esta LST. Além disso, sua identificação foi confirmada pela injeção de uma amostra de padrão autêntico, o que confirmou tanto os dados do espectro de massas, quanto o tempo de retenção. No modo de ionização positivo, a tagitinina A apresentou o íon m/z 369 $[M + H]^+$ e os íons fragmentos m/z 333 $[(M + H) - 2H_2O]^+$; m/z 281 $[(M + H) - C_4H_8O_2]^+$; m/z 263 $[(M + H) - C_4H_8O_2 - H_2O]^+$ e m/z 235 (BARUAH et al., 1979, 1994; PEREIRA et al., 1997).

Já o pico 14 foi identificado como tagitinina B a partir do padrão de fragmentação no espectro de massas. No modo de ionização positiva, a tagitinina B apresentou o íon m/z 367 $[M + H]^+$, e os íons fragmentos m/z 349 $[(M + H) - H_2O]^+$; m/z 331 $[(M + H) - 2H_2O]^+$; m/z 279 $[(M + H) - C_4H_8O_2]^+$; m/z 261 $[(M + H) - C_4H_8O_2 - H_2O]^+$ e m/z 235 (BARUAH et al., 1979, 1994; PEREIRA et al., 1997).

Da mesma forma, o pico 16 foi atribuído à tagitinina C por meio da comparação dos dados obtidos nos espectros de massas e no espectro no UV com as informações contidas no banco de dados para esta LST. Assim, a tagitinina C apresentou o íon m/z 349 $[M + H]^+$ no modo de ionização positiva, e os íons fragmentos m/z 331 $[(M + H) - H_2O]^+$, m/z 261 $[(331) - C_4H_8O_2]^+$ como pico base, m/z 243 $[(261) - H_2O]^+$ e m/z 215 (BARUAH et al., 1979, 1994; PEREIRA et al., 1997).

O pico 17 foi identificado com base nos dados dos espectros de massas e no espectro no UV, os quais sugeriram que poderia se tratar de uma LST e $C_{20}H_{30}O_7$ como possível fórmula molecular (calculada para o íon m/z 383,2114 $[M + H]^+$; 3,3ppm). No modo de ionização positivo, este composto apresentou o íon m/z 383 $[M + H]^+$. Dessa forma, após uma busca de possíveis compostos presentes em *Tithonia diversifolia* com estas características, concluiu-se que provavelmente, esta substância seria a 1 α -hidroxitirotundina-3-O-metil-éter (KURODA et al., 2007).

O pico 19 foi identificado como sendo possivelmente a LST 2 β -metoxidesoxitagitinina B. Esse pico cromatográfico apresentou espectro no UV característico para esta LST e o espectro de massas, no modo de ionização positivo, mostrou o íon m/z 381 $[M + H]^+$ como pico base, e do padrão de fragmentação esperado para este composto, apresentando os seguintes íons: m/z 363 $[(M + H) - H_2O]^+$, m/z 331 $[(363) - MeOH]^+$, m/z 292 $[(M + H) - RCO_2H]^+$, m/z 261 $[(292) - MeOH]^+$. Além disso, a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_7$ determinada (calculada para o íon m/z 381,1908 $[M + H]^+$; $C_{20}H_{29}O_7$ e erro 0,0ppm), também foi compatível com a

2 β -metoxidesoxitagitinina B, já identificada em folhas de *T. diversifolia* (ZDERO et al., 1987; PEREIRA et al., 1997).

O pico 18 mostrou os íons m/z 445 $[M + Na]^+$, m/z 423 $[M + H]^+$ e m/z 405 $[(M + H) - H_2O]^+$ como pico base, os quais estão de acordo com a LST piptocarpina A. O padrão de fragmentação do íon m/z 423 $[M + H]^+$ confirmou a identidade desse composto, uma vez que apresentou os seguintes íons no modo de ionização positivo: m/z 363 $[(M + H) - AcOH]^+$, m/z 345 $[(M + H) - HAc - H_2O]^+$, m/z 337 $[(M + H) - C_4H_6O_2]^+$, m/z 319 $[(M + H) - C_4H_6O_2 - H_2O]^+$, m/z 301 $[(M + H) - C_4H_6O_2 - 2H_2O]^+$. Além disso, o UV máximo em 286nm indica uma extensa conjugação na molécula e é típico de butadienolido (COWAL et al., 1981).

Já para o pico 20 propõe-se que seja correspondente à LST piptocarpina A esterificada com mais uma unidade acetato, o que pode ser deduzido com base nos íons obtidos e na fórmula molecular $C_{23}H_{29}O_{10}$ calculada pra m/z 465,1754 $[M + H]^+$ (erro 0,3ppm). O espectro de absorção no UV indicou um máximo de absorção em 288nm, semelhante ao UV máximo da piptocarpina A. No modo de ionização positivo, este composto apresentou fragmentação idêntica à da piptocarpina A, adicionada de mais uma perda de acetato. Apresentou os íons m/z 503 $[M + K]^+$, m/z 487 $[M + Na]^+$, m/z 465 $[M + H]^+$, m/z 447 $[(M + H) - H_2O]^+$, m/z 345 $[(M + H) - 2HOAc]^+$ e m/z 319.

O pico 21 foi identificado como sendo correspondente à piptocarpina B, que difere da piptocarpina A apenas pela presença de um grupo tiglato no lugar de um metacrilato na posição 8. No espectro de massas no modo positivo de ionização, foi possível observar a presença dos íons m/z 475 $[M + K]^+$, m/z 459 $[M + Na]^+$, m/z 437 $[M + H]^+$, m/z 419 $[(M + H) - H_2O]^+$, m/z 405 como pico base, m/z 319 $[(M + H) - C_5H_8O_2 - H_2O]^+$ e m/z 259 $[(M + H) - C_5H_8O_2 - HOAc - H_2O]^+$. Apresentou, assim, fragmentação muito semelhante às demais LST, além da absorção máxima no espectro no UV em 288nm.

Figura 3 - Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de *T. diversifolia* e *V. polyanthes*, respectivamente. A identificação dos picos cromatográficos consta na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação dos picos cromatográficos dos extratos das folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia* e dados de UV e espectrometria de massas obtidos por CLAE-UV-EM

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
1	5,7	355,1042 $[M + H]^+$ 163,0408 $[(M + H) - AQ]^+$ pb	353,0987 $[M - H]^-$ pb 191,9529 $[(M + H) - CAF]^-$	299, 328	ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	<i>V. polyanthes</i> <i>T. diversifolia</i>
2	7,3	355,3208 $[M + H]^+$ 179,0306 163,0390 $[(M + H) - AQ]^+$ pb	353,1001 $[M - H]^-$ pb 173,0908 $[(M - CAF) - H_2O]^-$	299, 330	ácido 4- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	<i>T. diversifolia</i>
3	8,9	355,1008 $[M + H]^+$ 163,0384 $[(M + H) - AQ]^+$ pb	353,0991 $[M - H]^-$ pb 191,2229 $[(M + H) - CAF]^-$ 179,0394	297, 328	ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	<i>V. polyanthes</i> <i>T. diversifolia</i>
4	13,3	369,1184 $[M + H]^+$ 355,2530 193,1572 177,0537 $[(M + H) - AQ]^+$ pb	449,2535 pb 367,1353 $[M - H]^-$ 191,9533 $[M - FER]^-$ 173,0944 $[(M - CAF) - H_2O]^-$	292, 327	ácido 4- <i>O-E</i> -feruloilquínico	<i>T. diversifolia</i>
5	14,6	391,2767 369,3437 355,3209 191,1429 pb 163,0354	529,2453 $[M - H]^-$ 447,2381 pb 367,1778 173,0861	295, 328	ácido 4,5- <i>O-E</i> -feruloilcafeoilquínico	<i>T. diversifolia</i>
6	15,4	335,0734 $[M + Na]^+$ 313,0883 $[M + H]^+$ 163,0287 pb	623,1830 311,0877 $[M - H]^-$ pb 149,0468 $[(M + H) - 162]^-$	295,328	mono- <i>O</i> -cafeoilxose	<i>T. diversifolia</i>
7	19,9	463,0881 $[M + H]^+$ pb 287,1713 $[(M + H) - (176)]^+$	461,0885 $[M - H]^-$ pb 285,0484 $[(M + H) - (176)]^-$	253, 267 (sh), 345	luteolina-7- <i>O</i> -glicuronil	<i>V. polyanthes</i>

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
8	21,8	517,1351 $[M + H]^+$ pb 499,1213 $[(M + H) - H_2O]^+$ 337,0931 163,0402	515,1379 $[M - H]^-$ pb 353,1088 $[(M + H) - CAF]^-$ 173,0954	296, 327	ácido 3,4-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	<i>T. diversifolia</i> <i>V. polyanthes</i>
9	23,0	447,0927 $[M + H]^+$ pb 271,0621 $[(M + H) - (176)]^+$	445,0928 $[M - H]^-$ pb	266, 335	apigenina-7- <i>O</i> -glicuronil	<i>V. polyanthes</i>
10	23,8	477,104 $[M + H]^+$ pb 301,1392 $[(M + H) - (176)]^+$	475,2676 $[M - H]^-$ pb	250 (sh), 266, 345	crisoeriol-7- <i>O</i> -glicuronil	<i>V. polyanthes</i>
11	24,3	517,1344 $[M + H]^+$ 499,1199 $[(M + H) - H_2O]^+$ 163,0400 pb	515,1384 $[M - H]^-$ pb 353,1001 $[(M + H) - CAF]^-$ 191,9549 $[(353) - CAF]^-$ 173,0955	299, 328	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico	<i>V. polyanthes</i>
12	25,2	733,3428 dímero 389,1523 $[M + Na]^+$ 367,1741 $[M + H]^+$ pb 349,1598 $[(M + H) - H_2O]^+$ 279,1208 $[(M + H) - RCO_2H]^+$ 261,1133 $[(279) - H_2O]^+$ 243,0997 $[(261) - H_2O]^+$	-----	290	provável 4 β ,10 α -diidroxí-3-oxo-8 β -isobutiriloxiguaia-11(13)-em-6,12-olido	<i>T. diversifolia</i>
13	28,1	369,1903 $[M + H]^+$ pb 333,1672 $[(M + H) - 2H_2O]^+$ 281,1332 $[(M + H) - C_4H_8O_2]^+$ 263,1263 $[(M + H) - C_4H_8O_2 - H_2O]^+$ 245,1167 $[(M + H) - C_4H_8O_2 - 2H_2O]^+$	-----		tagitinina A	<i>T. diversifolia</i>

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
14	28,4	367,1744 $[M + H]^+$ 349,1710 $[(M + H) - H_2O]^+$ 261,1075 $[(M + H) - H_2O - C_4H_8O_2]^+$ 257,1544 pb 243,0970	-----	238	tagitinina B	<i>T. diversifolia</i>
15	31,5	461,1078 $[M + H]^+$ pb 285,0729 $[M + H - (176)]^+$	459,1085 $[M - H]^-$ pb 283,2682 $[M - H - (176)]^-$	265, 330	acacetina-7- <i>O</i> -glicuronil	<i>V. polyanthes</i>
16	32,2	719,3037 dímero + Na 697,3130 dímero 371,1419 $[M + Na]^+$ 349,1586 $[M + H]^+$ 331,1492 $[(M + H) - H_2O]^+$ 261,1124 $[(M + H) - H_2O - C_4H_8O_2]^+$ pb 243,0992 $[(M + H) - 2H_2O - C_4H_8O_2]^+$ 215,1093	-----	253	tagitinina C	<i>T. diversifolia</i>
17	35,6	383,2114 $[M + H]^+$ 361,2333 329,1371 301,0764 285,2827 261,2681 257,2447	-----		provável 1 α -hidroxitirotundina-3- <i>O</i> -metil-éter	<i>T. diversifolia</i>

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
18	37,0	445,1414 $[M + Na]^+$ 423,1655 $[M + H]^+$ 405,1552 $[(M + H) - H_2O]^+$ pb 363,141 $[(M + H) - HOAc]^+$ 345,1368 $[(M + H) - HOAc - H_2O]^+$ 337,1235 $[(M + H) - C_4H_6O_2]^+$ 319,1188 $[(M + H) - C_4H_6O_2 - H_2O]^+$ 301,1013 $[(M + H) - C_4H_6O_2 - 2H_2O]^+$ 277,1038 259,0985	-----	288	piptocarpina A	<i>V. polyanthes</i>
19	41,1	403,1676 $[M + Na]^+$ 381,1908 $[M + H]^+$ pb 363,1808 $[(M + H) - H_2O]^+$ 331,1599 $[(363) - MeOH]^+$ 293,1408 261,1167 243,1022	-----		2 β -metoxidesoxitagitinina B	<i>T. diversifolia</i>
20	43,1	503,1244 $[M + K]^+$ 487,1571 $[M + Na]^+$ 465,1754 $[M + H]^+$ 447,1651 $[(M + H) - H_2O]^+$ pb 405,1546 $[(M + H) - HOAc]^+$ 345,1342 $[(M + H) - 2 HOAc]^+$ 319,1133 $[(M + H) - HOAc - C_4H_6O_2]^+$ 259,0975	-----	287	piptocarpina A esterificada com acetato	<i>V. polyanthes</i>

[illegible]

Figura 4 – Estruturas químicas dos ácidos clorogênicos e flavonoides identificados nas folhas de *T. diversifolia* e *V. polyanthes*.

Figura 5 – Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas identificadas nas folhas de *T. diversifolia* e *V. polyanthes*.

4.2 Identificação dos picos cromatográficos dos extratos das fezes, das lagartas, da hemolinfa, do corpo e da asa de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia* e em *V. polyanthes*.

A identificação dos metabólitos secundários vegetais nas fezes e no corpo de *C. lacinia*, tanto na fase larval quanto no indivíduo adulto, foi realizada a partir da comparação dos dados obtidos nas análises por CLAE-UV-EM dos extratos das fezes, das lagartas, da hemolinfa e das asas, e do corpo das borboletas, com os dados obtidos nas análises por CLAE-UV-EM dos extratos das folhas de *V. polyanthes* e dos extratos das folhas de *T. diversifolia*. Além disso, a identificação destes metabólitos também foi baseada nos principais mecanismos de destoxificação utilizados por Lepidoptera. É importante ressaltar que a prioridade foi identificar os metabólitos secundários vegetais, provenientes das folhas de *V. polyanthes* e de *T. diversifolia*, que foram excretados ou acumulados tanto na fase larval quanto no indivíduo adulto, na forma inalterada ou após metabolização.

4.2.1 Identificação dos picos cromatográficos dos extratos das fezes, das lagartas, da hemolinfa, do corpo e da asa de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia*.

Os extratos das fezes coletadas das lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia* durante o segundo, o terceiro e o quarto estágios apresentaram determinados metabólitos secundários das folhas de *T. diversifolia* excretados intactos, como pode ser observado na Figura 7. A observação dos cromatogramas dos extratos das fezes, correspondentes aos segundo e terceiro estágios das lagartas, mostra a presença das LST tagitinina A, tagitinina C e 2 β -metoxidesoxitagitinina, enquanto que a 4 β ,10 α -diidroxi-3-oxo-8 β -isobutiroiloxiguai-11(13)-en-6,12-olido foi observada apenas nas fezes do terceiro estágio. O cromatograma do extrato das fezes coletadas durante o quarto estágio apresentou a mono-*O*-cafeoilxose, a tagitinina B e a 1 α -hidroxitirofundina-3-*O*-metil-éter, além dos metabólitos secundários encontrados nas fezes do segundo e terceiro estágios.

Por outro lado, o cromatograma do extrato das lagartas no segundo estágio cultivadas em *T. diversifolia* demonstrou que não houve acúmulo dos metabólitos secundários da planta no corpo das mesmas, enquanto os cromatogramas dos extratos das lagartas no terceiro e no quarto estágios evidenciaram o acúmulo de determinados metabólitos secundários vegetais no corpo deste herbívoro, como pode ser observado na Figura 6. Os metabólitos secundários encontrados nas lagartas do terceiro e do quarto estágios foram de acordo com a ordem de eluição: $4\beta,10\alpha$ -diidroxi-3-oxo-8 β -isobutiroiloxiguai-11(13)-en-6,12-olido, tagitinina A, tagitinina B, tagitinina C, 1 α -hidroxitirodina-3-O-metil-éter e 2 β -metoxidesoxitagitinina. Com relação ao extrato de hemolinfa coletada das lagartas no quarto estágio, e aos extratos do corpo e da asa dos insetos adultos (borboletas), podemos observar, na Figura 8, ausência de metabólitos secundários das folhas de *T. diversifolia*.

A ausência de metabólitos secundários originados das folhas de *T. diversifolia* na hemolinfa, no inseto adulto e nas lagartas do segundo estágio, pode ser justificada pelo fato de que tanto para os indivíduos na fase larval, quanto para os adultos, o sequestro de metabólitos das plantas deve ser acompanhado pela prevenção da autointoxicação, principalmente, no mais importante sistema de transporte destes compostos, a hemolinfa. Altos custos fisiológicos podem estar envolvidos neste processo, devido à necessidade de construção de locais de armazenamento, tais como glândulas e outras adaptações fisiológicas e morfológicas (OPITZ; MÜLLER, 2009), como, por exemplo, transformações enzimáticas dos aleloquímicos das plantas a compostos menos tóxicos às membranas ou aos constituintes da hemolinfa. Também vale ressaltar que algumas espécies de Lepidoptera sequestram metabólitos das plantas apenas durante a fase larval e descartam todos os compostos sequestrados durante a muda para pupa ou para a fase adulta, como, por exemplo, a *Euploea core amymone* (NISHIDA, 2002), o que pode justificar a ausência de metabólitos secundários das folhas de *T. diversifolia* no inseto adulto.

De acordo com Ambrósio et al (2008), *C. lacinia* se alimenta exclusivamente da face adaxial durante o estágio larval, formando um fino filme de epiderme na face abaxial, rica em tricomas glandulares contendo LST, que não são consumidas. Porém, observações em campo mostram que apenas as lagartas no primeiro e no segundo estágios se alimentam exclusivamente da face adaxial das folhas de *T.*

diversifolia, evitando a face abaxial. A partir do terceiro estágio, e principalmente a partir do quarto estágio larval, observa-se que as lagartas de *C. lacinia* passam a se alimentar também da face abaxial, esqueletonizando as folhas e somente evitando alimentar-se das nervuras (CLARK; FAETH, 1997). Isso justifica o acúmulo de LST apenas pelas lagartas do terceiro e do quarto estágios, evidenciando uma evolução adaptativa de *C. lacinia* que a permite alimentar-se de partes das folhas de *T. diversifolia* ricas em LST e acumular estas LST a partir do terceiro estágio larval. A vantagem da capacidade deste acúmulo, principalmente de LST, provavelmente é a proteção contra predadores, uma vez que, as LST apresentam propriedades tóxicas e podendo, portanto, tornar as lagartas deterrentes (SCHMIDT, 1999; OPITZ; MÜLLER, 2009).

Nota-se que, apesar de eficaz, em muitos casos, o arsenal químico das plantas pode exercer uma pressão seletiva sobre seus inimigos naturais e adquirir insetos herbívoros adaptados, capazes de driblar suas defesas químicas. No caso das lagartas do terceiro e do quarto estágios, capazes de acumular metabólitos das folhas de *T. diversifolia*, essas provavelmente apresentam sítios de ligação insensíveis a determinada toxina, bem como determinados comportamentos preventivos de intoxicações (WINDE et al., 2011; SCHRAMM et al., 2012). Assim, provavelmente, o acúmulo de metabólitos originados de *T. diversifolia* por estas lagartas envolve comportamentos importantes, tais como: absorção seletiva de determinados metabólitos; controle da concentração de metabólitos acumulados e armazenamento adequado (HARBORNE, 2001).

Por outro lado, podemos observar que determinados metabólitos não foram apenas acumulados pelas lagartas do terceiro e do quarto estágios alimentadas com folhas de *T. diversifolia*, mas também foram excretados sob a forma inalterada e estão presentes nos extratos das fezes destas lagartas. Provavelmente, nas quantidades em que estes metabólitos são encontrados nas folhas, os mecanismos pelos quais os insetos acumulam estes compostos estão saturados e, portanto, estes são liberados nas fezes (FERRERES et al., 2009), ou então, estes compostos atingiram a concentração máxima no tecido da lagarta a partir da qual passam a ser tóxicos, oferecendo mais riscos do que benefícios e por esse motivo, devem ser eliminados do organismo. Outro mecanismo capaz de justificar a presença de metabólitos secundários inalterados derivados da dieta nas fezes destes herbívoros é a redução da absorção. De acordo com este mecanismo, insetos herbívoros, como

lagartas de Lepidoptera, apresentam matrizes extracelulares compostas por microfibras de quitina ligadas a uma mistura de proteínas, glicoproteínas e peptideoglicanos. Estas matrizes extracelulares são chamadas de membranas peritróficas (MPs). As MPs formam uma bainha fina em torno do conteúdo do lúmen do intestino e ainda, nos casos que envolvem aleloquímicos ou complexos aleloquímicos que não permeiam facilmente as MPs, estas podem funcionar como uma primeira defesa, reduzindo a absorção desses compostos. Isso pode ocorrer com as LST que podem se ligar a grupos nucleofílicos das proteínas, dificultando a absorção (BARBEHENN, 2001; FRANKFATER et al., 2005).

4.2.2 Identificação dos picos cromatográficos dos extratos das fezes e das lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *V. polyanthes*.

O cromatograma do extrato das fezes das lagartas no segundo estágio cultivadas em *V. polyanthes* mostrou a presença de alguns metabólitos secundários encontrados também no extrato das folhas desta planta. Estes compostos, identificados e apresentados na Figura 9, são: apigenina-7-*O*-glicuronil, crisoeriol-7-*O*-glicuronil, acacetina-7-*O*-glicuronil - excretados sob a forma inalterada - e, as agliconas apigenina e acacetina, correspondentes aos picos 23 e 24, respectivamente. A flavona apigenina foi atribuída ao pico 23 (Figura 33 - Apêndice A), uma vez que, este apresentou absorção máxima em 266 e 335nm no espectro no UV, e no modo de ionização positivo, o espectro de massas apresentou o íon m/z 271 $[M + H]^+$ como pico base. A fórmula molecular $C_{15}H_{11}O_5$, calculada para m/z 271,0580 $[M + H]^+$ também é compatível com esta flavona. O pico 24 (Figura 34 - Apêndice A) mostrou máximo de absorção no UV em 265 e 330nm. O espectro de massas deste pico apresentou o íon m/z 285 $[M + H]^+$ como pico base no modo de ionização positivo e a fórmula molecular $C_{16}H_{13}O_5$ calculada para m/z 295,0734 $[M + H]^+$ também é compatível com a flavona acacetina. A identificação destas duas agliconas é corroborada pelo fato de estarem presentes nas folhas de *V. polyanthes* sob a forma glicuronizada.

Podemos observar que apigenina e acacetina sofreram metabolização prévia pelas lagartas, uma vez que no extrato das folhas de *V. polyanthes*, as agliconas se

apresentaram glicuronizadas (Pico 9 - Figura 19-Apêndice A e Pico 15 - Figura 25-Apêndice A). As lagartas podem ter clivado o ácido glicurônico para sua subsequente nutrição (OPITZ; MÜLLER, 2009), formando as agliconas.

Com relação ao extrato das lagartas do segundo estágio também cultivadas com folhas de *V. polyanthes*, o cromatograma apresentado na Figura 9 mostrou que houve acúmulo apenas do flavonoide apigenina-7-*O*-glicuronil e do ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico hidroxilado. A hidroxilação deste ácido clorogênico foi identificada pela presença dos íons m/z 371 $[M + H]^+$, correspondente ao ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico hidroxilado, e m/z 355 $[(M + H) - 16]^+$, correspondente ao ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico (SANTOS et al., 2005). Visto que esse metabólito não foi observado nas folhas de *V. polyanthes*, deduz-se que o acúmulo deste ácido clorogênico hidroxilado, provavelmente ocorre após destoxificação do ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico por um mecanismo de fase I de biotransformação, que tem como objetivo primordial introduzir grupos polares e reativos nas moléculas (CHAHINE; O'DONNELL, 2010).

De acordo com Cipollini et al (2008), ácidos clorogênicos podem apresentar efeitos anti-insetos e deterrentes alimentares, portanto, o acúmulo de ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico hidroxilado, de alguma forma, pode ter sido tóxico para as lagartas de *C. lacinia*. Apesar da tentativa de destoxificar o excesso de ácido clorogênico, *C. lacinia* acabou produzindo um derivado aparentemente mais tóxico por um mecanismo de fase I.

De forma semelhante, o acúmulo de apigenina-7-*O*-glicuronil também deve ter sido tóxico, uma vez que, Qi et al (2008) demonstraram que o flavonoide glicuronizado luteolina 4'-*O*-glicuronil possui ação deterrente alimentar contra larvas no segundo estágio de *Spodoptera litura* e citotoxicidade em cultura de células deste inseto. É importante ressaltar que as lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *V. polyanthes* se desenvolveram apenas até o segundo estágio, morrendo logo em seguida.

Figura 6 - Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de *T. diversifolia* e das lagartas cultivadas em *T. diversifolia* no 2º, 3º e 4º estágios, respectivamente.

Figura 7 - Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de *T. diversifolia* e das fezes das lagartas cultivadas em *T. diversifolia* no 2º, 3º e 4º estágios, respectivamente.

Figura 8 - Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de *T. diversifolia*, das asas e corpo das borboletas e da hemolinfa, respectivamente.

Figura 9 - Cromatogramas registrados em 270nm e obtidos a partir das análises por CLAE-UV-EM para os extratos das folhas de *V. polyanthes*, das lagartas cultivadas em *V. polyanthes* e das fezes das lagartas, respectivamente.

Tabela 2: Identificação dos picos cromatográficos referentes aos compostos formados pela metabolização por *C. lacinia*.

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
1	4,9	371,3098 $[(M + H) + 16]^+$ 355,1572 $[M + H]^+$ 163,0575	369,1566 $[(M - H) + 16]^+$ 353,1570 $[M - H]^-$		ácido 3- <i>O-E</i> -cafeoilquínico hidroxilado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>V. polyanthes</i>
23	32,4	271,0578 $[M + H]^+$ pb	-----	266, 335	apigenina	Fezes de lagartas 2º estágio cultivadas com <i>V. polyanthes</i>
24	43,7	285,0723 $[M + H]^+$ pb	-----	265, 330	acacetina	Fezes de lagartas 2º estágio cultivadas com <i>V. polyanthes</i>
26	11,4	380,0855 pb 190,5469	461,185 378,0880 112,9849 pb	250, 290 (sh), 450	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>V. polyanthes</i>
27	14,6	424,0746 pb 212,5401	422,0789 pb	245, 290 (sh), 450	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>V. polyanthes</i>
28	5,5	595,3706 429,2361 391,2846 pb 149,023	-----	275	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
29	11,4	380,0905 pb 363,0623 307,0739 170,0467	-----	250, 290 (sh), 450	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
30	14,4	424,0766 pb 279,1604		245, 290 (sh), 450	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
31	67,7	611,2795 pb 475,3209 301,1414	-----	240, 400	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
32	70,2	625,2575 pb 475,3199 393,2947 365,1312	-----	240, 430	não identificado	Lagartas 2º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
33	2,9	430,1599 pb 286,1408 268,1073	266,1039 164,0805 pb	260	não identificado	Fezes de lagartas do 2º, 3º e 4º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
34	8,0	-----	-----	260, 290	não identificado	Fezes de lagartas do 2º, 3º e 4º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
35	14,5	-----	-----	255, 268, 285	não identificado	Fezes de lagartas do 2º, e 3º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
36	20,2	647,3653 477,2315 333,1917 pb	-----	265	não identificado	Fezes de lagartas do 2º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>

Número dos picos	Tempo de retenção (min)	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização positivo	Íons observados (m/z) no cromatograma TIC (CLAE-EM) no modo de ionização negativo	UV máx (nm)	Substâncias	Ocorrência
37	22,5	507,2702 254,1399 pb	505,2792 252,1366 pb	275	não identificado	Fezes de lagartas do 2º, 3º e 4º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
38	77,6	-----	-----	440	não identificado	Fezes de lagartas do 2º, 3º e 4º estágio cultivadas com <i>T. diversifolia</i>
39	14,1	-----	-----	275		Asas
40	35,8	-----	-----	250	não identificado	Asas

4.3 Experimentos de performance de *C. lacinia* em *T. diversifolia* e em *V. polyanthes*

As lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia* se desenvolveram até o quarto estágio larval completando a metamorfose para a fase adulta, enquanto que as lagartas cultivadas em *V. polyanthes* se desenvolveram apenas até o segundo estágio larval. A taxa de mortalidade das lagartas foi de 100% nos três cultivos feitos com folhas de *V. polyanthes* e de 0%, 2% e 3% nos três cultivos feitos com folhas de *T. diversifolia*. Como pode ser observado na Figura 10, as lagartas no segundo estágio alimentadas com folhas de *T. diversifolia* apresentaram peso médio maior do que aquelas alimentadas com folhas de *V. polyanthes*. O resultado da análise estatística, feita por teste-T, mostrou que a diferença entre o peso médio das lagartas no segundo estágio alimentadas com folhas de *T. diversifolia* e o peso médio das lagartas no segundo estágio alimentadas com folhas de *V. polyanthes* é estatisticamente significativo ($p = 0,003$), considerando-se $p < 0,05$.

Figura 10 - Peso médio das das lagartas de *C. lacinia* (n = 10 em triplicata) alimentadas com *T. diversifolia* (Td) e *V. polyanthes* (Vp) em cada estágio do seu desenvolvimento.

Dessa forma, sugere-se que *V. polyanthes* possui metabólitos secundários que dificultam o desenvolvimento das lagartas, ou ainda, apresentam ausência de

algum metabólito secundário imprescindível para o crescimento delas. De acordo com as análises por CLAE-UV-EM, podemos observar que as folhas de *T. diversifolia* e de *V. polyanthes* diferem consideravelmente em relação à composição química de seus metabólitos secundários, uma vez que, flavonoides glicuronizados e LST do subtipo hirsutinolido foram identificados apenas nas folhas de *V. polyanthes*. Enquanto que LST dos subtipos furanoeliangolido e heliangolido foram identificadas apenas nas folhas de *T. diversifolia*. Podemos ainda observar a presença de LST, tanto nas fezes quanto nas lagartas no terceiro e no quarto estágios cultivadas em *T. diversifolia* e a ausência destas nas fezes e nas lagartas cultivadas em *V. polyanthes*.

As LST do subtipo heliangolido são caracterizadas pela presença de um grupo metileno exocíclico conjugado com um grupo carbonila de uma γ -lactona, os quais estão fortemente associados à alquilação seletiva de grupos nucleofílicos, ou seja, estes compostos reagem fortemente com átomos ricos em elétrons, tais como enxofre e oxigênio presentes em proteínas e ácidos nucleicos (BARUAH et al., 1994; FRANKFATER et al., 2005). Esta capacidade de ligação às macromoléculas biológicas pode explicar as propriedades tóxicas deste subtipo de LST (BARUAH et al., 1994; FRANKFATER et al., 2005; AMBRÓSIO et al., 2008). Além disso, os heliangolidos presentes nas folhas de *T. diversifolia* têm mostrado fitotoxicidade, efeitos inibitórios do crescimento vegetal (BARUAH et al., 1994), e deterrência alimentar contra *Epilachna vigintioctopunctata* (F.) (Coleoptera: Coccinellidae) (DUTTA et al., 1986, 1993).

Apesar disso, as lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia* se desenvolveram até a fase adulta e apresentaram acúmulo de LST no terceiro e no quarto estágios. Dada a toxicidade das LST presentes nas folhas de *T. diversifolia*, e a evidente capacidade de *C. lacinia* de alimentar-se e acumular estas LST, uma provável justificativa para o desenvolvimento completo das lagartas de *C. lacinia* cultivadas em *T. diversifolia* e ainda para a morte deste herbívoro quando cultivado em *V. polyanthes*, seria uma tolerância específica desenvolvida por *C. lacinia* aos subtipos de LST presentes nas folhas de *T. diversifolia*.

É importante ressaltar que as LST do subtipo hirsutinolido têm apresentado propriedades citotóxicas (COWALL et al., 1981; CHEN et al., 2005), antibacterianas (KOS et al., 2006) e efeitos antiplasmódios (PILLAY et al., 2007; BUSKUHL et al., 2010) portanto, uma provável explicação para a ação tóxica das folhas de *V.*

polyanthes na performance de *C. lacinia* é a presença de LST do subtipo hirsutinolido nesta planta.

As LST do subtipo hirsutinolido presentes em *V. polyanthes* apresentam anel lactônico insaturado e uma conjugação extendida; ausência do grupamento 11,13-exo-metilênico; ésteres metacrilato (piptocarpina A) ou tiglate (piptocarpina B) em C-8 e acetato esterificado em C-13. Por outro lado, as LST dos subtipos furanoeliangolido e heliangolido, presentes em *T. diversifolia*, apresentam anel lactônico saturado com ligação dupla exocíclica (grupamento 11,13-exo-metilênico) e éster isobutil esterificado em C-8. Ainda, a tagitinina C, LST majoritária nos extratos das folhas de *T. diversifolia*, é uma LST do subtipo heliangolido, que não apresenta anel furânico (ponte etérea entre C-3 e C-10), como as demais LST identificadas, entre elas, a piptocarpina A, LST majoritária do subtipo hirsutinolido presente no extrato das folhas de *V. polyanthes*.

Apesar das diferenças estruturais entre os subtipos de LST encontrados nas duas plantas, podemos observar que em relação à provável toxicidade apresentada pelas LST do subtipo hirsutinolido para as lagartas de *C. lacinia*, a principal diferença estrutural é a presença da dupla exocíclica nos furanoeliangolidos e heliangolidos, e a presença da conjugação extendida no anel lactônico e ausência da dupla exocíclica nas LST do subtipo hirsutinolido. Portanto, o fato de as LST de *V. polyanthes* serem de outro subtipo estrutural, pode representar uma importante causa para o desenvolvimento deficiente e para a morte das lagartas quando cultivadas com folhas desta planta. Enquanto que, talvez os subtipos de LST encontrados em *T. diversifolia* sejam necessários ao desenvolvimento das lagartas, uma vez que foram acumulados nos últimos estágios larvais e as lagartas apresentaram melhor performance nessa planta.

Em relação aos flavonoides glicuronizados, apenas as folhas de *V. polyanthes* os apresentaram em sua composição. De acordo com Qi et al. (2008), luteolina 4'-O-glicuronil, luteolina e apigenina, isoladas de *Enhalus acoroides*, apresentaram deterrência alimentar contra larvas de *Spodoptera litura* no segundo estágio larval. Em outro estudo, as flavonas apigenina e luteolina foram consideradas fitoestrógenos disruptores do ciclo de muda. No caso da Lepidoptera *Spodoptera littoralis*, suas larvas e pupas se tornaram menores com a alimentação contínua de folhas com alta concentração de apigenina. Ainda, determinada dieta contendo apenas apigenina mostrou deterrência alimentar, enquanto uma dieta contendo

apenas luteolina apresentou estímulo à alimentação. Apesar de a resistência alimentar da planta depender do balanço entre estimulantes e deterrentes, o efeito deterrente alimentar da apigenina e de outros compostos pode ter sido parcialmente responsável pela forte deterrência de extratos brutos e pela baixa taxa de herbivoria em folhas de *Lonicera maackii* (CIPOLLINI et al., 2008). Assim, a presença de apigenina-7-*O*-glicuronil, de luteolina-7-*O*-glicuronil, e de outros flavonoides possivelmente deterrentes alimentares nas folhas de *V. polyanthes*, também pode ser parcialmente responsável pelo desenvolvimento deficiente e pela morte das lagartas de *C. lacinia* alimentadas com folhas desta planta.

Por outro lado, ainda não podemos afirmar que a presença de determinado metabólito secundário ou de determinada classe de metabólitos secundários é responsável pelo desenvolvimento deficiente ou pela morte das lagartas alimentadas com *V. polyanthes* da mesma forma que não é possível determinar se algum metabólito, ou metabólitos de *T. diversifolia* é responsável direto pelo desenvolvimento completo das lagartas cultivadas com suas folhas. Em ambos os casos, seriam necessários experimentos adicionais de performance e de preferência alimentar.

5. Conclusões

As análises por CLAE-UV-EM dos extratos das folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia* permitiram a identificação de 22 substâncias entre ácidos clorogênicos, flavonoides e LST. As folhas de *V. polyanthes* apresentaram 12 destas substâncias, sendo estas, ácidos clorogênicos, flavonoides glicuronizados e LST do subtipo hirsutinolido. Já as folhas de *T. diversifolia* apresentaram 13 das 22 substâncias, tais como ácidos clorogênicos e LST dos subtipos furanoeliangolido e heliangolido.

Pode-se inferir que a diferença na composição química entre as folhas de *V. polyanthes* e *T. diversifolia*, provavelmente foi a causa para performances muito diferentes nos cultivos da lagarta *C. lacinia* com estas plantas. Enquanto as lagartas alimentadas com *V. polyanthes* se desenvolveram apenas até o segundo estágio larval, morrendo logo após a primeira muda, as lagartas alimentadas com *T. diversifolia* se desenvolveram normalmente até a fase adulta.

Além disso, como o peso médio das lagartas no segundo estágio larval dos três cultivos feitos com *T. diversifolia* foi estatisticamente maior do que o peso médio das lagartas no mesmo estágio dos três cultivos feitos com *V. polyanthes*, também, pode-se concluir que muito provavelmente as folhas de *V. polyanthes* apresentam algum metabólito (s) capaz (es) de impedir o desenvolvimento de *C. lacinia*, sendo possivelmente tóxicos para essa Lepidoptera. Por outro lado, as folhas de *T. diversifolia* possuem composição química que satisfaz as necessidades de *C. lacinia* provavelmente, apresentando metabólitos que permitem às lagartas se desenvolver plenamente. Ainda, *C. lacinia* pode ter se tornado tolerante aos metabólitos secundários apresentados por sua planta hospedeira *T. diversifolia*.

Também conclui-se que as lagartas no terceiro e quarto estágios, alimentadas com *T. diversifolia*, acumularam metabólitos secundários ingeridos a partir das folhas, principalmente LST. Em relação à excreção, as lagartas tratadas com *T. diversifolia* foram capazes de excretar alguns metabólitos sob a forma inalterada em todos os estágios larvais, já as lagartas tratadas com *V. polyanthes* excretaram apenas flavonoides glicuronizados sob a forma inalterada e duas flavonas.

Por outro lado, estas conclusões ainda não nos permitem afirmar com certeza quais metabólitos presentes em *V. polyanthes* foram nocivos para *C. lacinia* e quais os metabólitos encontrados em *T. diversifolia* foram capazes de auxiliar no

desenvolvimento e de estimular a alimentação das lagartas. Porém, sugere-se que a presença de flavonoides glicuronizados e LST do subtipo hirsutinolido em *V. polyanthes* podem justificar, ao menos parcialmente, o desenvolvimento deficiente e a morte de *C. lacinia* quando cultivada com esta planta. Enquanto que a presença de LST dos subtipos furanoeliangolido e heliangolido nas folhas de *T. diversifolia* podem ser favoráveis ao desenvolvimento completo deste herbívoro na presença desta planta.

6. Referências Bibliográficas

ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 33-47, 2010.

ARNASON, J. T.; BERNARDS, M. A. Impact of constitutive plant natural products on herbivores and pathogens. **Canadian Journal of Zoology**, v. 88, p. 615-627, 2010.

ALVES, V. F. G.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* (Less) Asteraceae. **Rev. Univ. Rural, Ser. Ciên. Vida**, v. 22, p. 01-08, 2003.

AMBRÓSIO, S.R. et al. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052–2060, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. Technical problems and practical operations in plant metabolomics. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, p. 300-304, 2006.

BANCHIO, E.; ZYGADLO, J; VALLADARES, G.R. Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6903-6909, 2005.

BARBEHENN, R. V. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, p. 86–99, 2001.

BARUAH, N. C. et al. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 11 p. 1831 – 1834, 1979.

BARUAH, N. C. et al. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and flavone from *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 29 – 36, 1994.

BAZON, J. N. et al. Cadinanolides and other constituents from *Vernonia fruticulosa* and *Vernonanthura discolor*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1535-1536, 1997.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the Vernonieae (Compositae). **Plant, Systematics and Evolution**, suppl. 4, p. 3-43, 1990.

BOHLMANN, F. et al. Allenic germacranolides, bourbonene derived lactones and other constituents from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 20, p. 473-480, 1981.

BOHLMANN, F. et al. Naturally occurring terpene derivatives. Part 362, Hirsutinolides from *Vernonia* species. **Phytochemistry**, v. 20, p. 2233-2237, 1981.

BOHLMANN, F. et al. Further hirsutinolides from *Vernonia polyanthes*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2863-2864, 1983.

BUSKUHL, H. et al. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1539–1544, 2010.

BREMER, K. **Asteraceae – Cladistics & Classification**. Portland: Timber Press, p. 752, 1994.

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

CHEN, X. et al. Sesquiterpene lactones with potent cytotoxic activities from *Vernonia chinensis*. **Planta Medica**, v. 71, p. 949–954, 2005.

CIPOLLINI, D. et al. Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 144-152, 2008.

CLARK, B. R.; FAETH, S. H. The consequences of larval aggregation in the butterfly *Chlosine lacinia*. **Ecological Entomology**, v. 22, p. 408-415, 1997.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of Chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2900–2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3821–3832, 2005.

COWALL, P. L. et al. Isolation and Structure Determination of Piptocarphins A-F, Cytotoxic Germacranolide Lactones from *Piptocarpha chontalensis*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 46, p. 1114-1120, 1981.

CROTTI, A. E. M. et al. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. *In*: TAFT, C.A. (Ed.), **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Research Signpost: Kerala, India, pp. 99-141, 2006.

DRUMMOND III, B. A.; BUSH, G. L.; EMMEL, T. C. The biology and laboratory culture of *Chlosyne lacinia* Geyer (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterist's society**, v. 24, p. 135-142, 1970.

DUFFEY, S. S. Sequestration of plant natural products by insects. **Annual Reviews in Entomology**, v. 25, p. 447-477, 1980.

DUTTA, P. et al. Feeding deterrents for *Philosamia ricini* (*Samia cynthia* subsp. *Ricini*) from *Tithonia diversifolia*. **Phytoparasitica**, v. 14, p. 77-80, 1986.

DUTTA, P.; CHAUDHURI, R. P.; SHARMA, R. P. Insect feeding deterrents from *Tithonia diversifolia* (Hemsl). Gray. **Journal of Environmental Biology**, v. 14, p. 7-33, 1993.

EL-HELA, A. A; AL-AMIER, H. A; IBRAHIM, T. A. Comparative study of the flavonoids of some Verbena species cultivated in Egypt by using high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6388–6393, 2010.

ELUFIOYE, T. O.; AGBEDAHUNSI, J. M. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 167-171, 2004.

ERASTO, P.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.117-120, 2006.

ERLICH, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: a study in coevolution. **Evolution**, v. 18, p. 586-608, 1964.

FERRERES, F. et al. Phenolics metabolism in insects: *Pieris brassicae*-*Brassica oleracea* var. *costata* Ecological Duo. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 9035–9043, 2009.

FRANKFATER, C. et al. Processing of a sesquiterpene lactone by *Papilio glaucus* caterpillars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 2541-2552, 2005.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**, 10ed, Piracicaba: FEALQ, 2002.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Physiology**, v. 156, p. 145-169, 2002.

GENC, H. Determination of sex in pupae of *Phyciodes phaon* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Florida Entomologist**, v. 88, p. 536-537, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1193-1204, 2008.

GOBBO-NETO, L. et al. Dereplication of secondary metabolites of foliar extracts from *Tithonia diversifolia* and *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by HPLC-DAD-MS. **2nd Brazilian Conference on Natural Products**, 2009.

GOFFIN, E. et al. In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, p. 543-545, 2002.

GRANDE, T. S. M. et al. Botanical survey on medicinal plants used by the populations of the state of Minas Gerais, Brasil. **Simpósio de Química e Farmacologia de Produtos Naturais**, 1989.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4ed, Elsevier Academic Press: London, Reino Unido. 1993.

HARBORNE, J. B. Twenty-five years of chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 361-379, 2001.

HARTWIG, U. A. et al. Chrysoeriol and luteolin released from Alfafa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 92, p. 116-122, 1990.

HERZ, W. **Proceedings of the International Compositae Conference**, Kew, 1994, v.1, Systematics, eds Hind, D.J.N.; Beenjtje, H.; Pope, G.V. Royal Botanical Garden: Kew, UK, p. 229-251, 1996.

HIGGINS, L. G. Revision of *Phyciodes* Hübner and related genera, with a review of the classification of the Melitaeinae (Lepidoptera: Nymphalidae). **Bull. Brit. Mus. Nat. Hist**, v. 43, p. 77-243, 1981.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 18-32, 2001.

JAKUPOVIC, J. et al. New vernolepin derivatives from *Vernonia glabra* and glaucolides from *Vernonia scorpioides*. **Planta Medica**, v. 5, p. 378-380, 1985.

JANSEN, J. J. et al. Metabolomic analysis of the interaction between plants and herbivores. **Metabolomics**, v. 5, p.150-161, 2009.

JANSEN, J. J. et al. The photographer and the greenhouse: how to analyse plant metabolomics data. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 48-60, 2009.

JONES, S. B. A revision of *Vernonia* series *Buddleiifoliae* (Compositae: Vernonieae). **Brittonia**, v. 34, p. 102-117, 1982.

JOHNSON, C. E. et al. Identification of phenolic components of *Vernonia amygdalina* and *Russelia equisetiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 4, p. 57-64, 2011.

JUSTUS, C. M.; PASINI, A.; DE OLIVEIRA, E. D. M. Biologia e preferência da lagarta do girassol, *Chlosyne lacinia saundersii* (Lepidoptera: Nymphalidae) na planta daninha losna branca, *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 163-166, 2003.

KIRK, H. et al. Can plant resistance to specialist herbivores be explained by plant chemistry or resource use strategy? **Oecologia**, v. 168, p. 1043-1055, 2012.

KOS, O. et al. Ent-kaurane glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolide type from *Vernonia triflosculosa*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 62–69, 2006.

KURODA, M. et al. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1240–1244, 2007.

KUWABARA, H. et al. Tricin from a *Malagasy connaraceous* plant with potent antihistaminic activity. **Journal of Natural Products**. v. 66, p. 1273-1275, 2003.

LA DUKE, J.C. Revision of *Tithonia*. **Rhodora**, v. 84, n. 840, p. 453-522, 1982.

LEITÃO-FILHO, H. F. **Contribuição ao conhecimento taxonômico da tribo Vernonieae no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. ESALQ, Piracicaba. pp. 215, 1972.

LOPES, J. L. C. **Lactonas sesquiterpênicas e atividade biológica de espécies brasileiras de Vernonia Scrb.** Tese de Livre-Docência. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. pp. 123, 1980.

LOURENÇÃO, A. L.; UNGARO, M. R. G. Preferência para alimentação de lagartas de *Chlosyne lacinia Saundersii* Doubleday & Hewitson, 1849 em cultivares de girassol. **Bragantia**, v. 42, p. 281-286, 1983.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. 1ed, Springer-Verlag New York. Berlin:Germany. 1970.

MABRY, T. T.; ABDEL-BASER, Z.; PADOLINA, W. G. Systematic implications of flavonoids and sesquiterpene lactones in species of *Vernonia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 185-192, 1975.

MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Academic Press: London. 1982.

MIURA, T. et al. Antidiabetic effect of Nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 28, p. 2152-2154, 2005.

MORITZ, T.; JOHANSSON, A. I. Plant metabolomics. *In*: Griffiths, W.J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, Reino Unido. p. 303, 2008.

NAGY, T. O. et al. Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. **Food Chemistry** v. 128, p. 530–534, 2011.

NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual Reviews in Entomology**, v. 47, p. 57–92, 2002.

NORDSTRÖM, A. Data mining for metabolomics. *In*: Griffiths, W.J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, Reino Unido. p. 303, 2008.

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

OWOYELE, V. B. et al. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 317-321, 2004.

PASSREITER, C. M.; ISMAN, M. B. Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by c-aminobutyric acid. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 371-377, 1997.

PEREIRA, P. S. et al. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1445-1448, 1997.

PÉREZ, A. L.; OLGA, L. M.; ROMO DE VIVAR, A. Sesquiterpenoids and diterpenoids from *Tithonia longiradiata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4227-4231, 1992.

PÉREZ, A. L.; ORTEGA, A.; ROMO DE VIVAR, A. An acyclic diterpene and sesquiterpene lactones from *Tithonia pendunculata*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3897-3901, 1998.

PETROVICIU, I.; ALBU, F.; MEDVEDOVICI, A. LC/MS and LC/MS/MS based protocol for identification of dyes in historic textiles. **Microchemical Journal**, v. 95, p. 247–254, 2010.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 255-281, 1986.

PILLAY, P. et al. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1200–1205, 2007.

PUKALSKAS, A. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. **Food Chemistry**, v. 130, p. 695–701, 2012.

QI, S. –H. et al. Antifeedant, antibacterial, and antilarval compounds from the South China Sea seagrass *Enhalus acoroides*. **Botanica Marina**, v. 51, p. 441-447, 2008.

RAYMOND, N. W. Foodplant ecology of the butterfly *Chlosyne lacinia* (Geyer) (Nymphalidae). 1. Larval foodplants. **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 27, p. 22-33, 1973.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contributions to Botany**, v.89, p.1-116, 1999.

RÜNGELER, P. et al. Study of three sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-kappa B and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets. **Planta Medica**, v. 64, p. 588-593, 1998.

SALAWU, S. O. et al. HPLC/DAD/MS characterization and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1568-1574, 2009.

SALAWU, S. O. et al. Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 486-492, 2011.

SANTOS, M. D. et al. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 62-70, 2005.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v. 3, p. 577-608, 1999.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant biology**. Oxford University Press : Oxford, Reino Unido, 2 ed., 2005.

SCHRAMM, K. et al. Metabolism of glucosinolate-derived isothiocyanates to glutathione conjugates in generalist lepidopteran herbivores. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 174-182, 2012.

SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, 1982.

SHI, P. et al. Systematic Characterisation of Secondary Metabolites from *Ixeris sonchifolia* by the Combined Use of HPLC-TOFMS and HPLC-ITMS. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 66–73, 2011.

SIEDLE, B. et al. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 6042-6054, 2004.

SILLÉN-TULLBERG, B.; BRYANT, E. H. The evolution of aposematic coloration in distasteful prey: an individual selection model. **Evolution**, v. 37, p. 993-1000, 1983.

STAMP, N. E. Egg deposition patterns in butterflies: why do some species cluster their eggs rather than deposit them singly? **American Naturalist**, v. 115, p. 367-380, 1980.

SUROWIEC, I; SZOSTEK, B; TROJANOWICZ, M. HPLC-MS of anthraquinoids, flavonoids, and their degradation products in analysis of natural dyes in archeological objects. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2070–2079, 2007.

TING, M; MA, X.; HANSON, F. E. Induction of feeding preference in larvae of patch butterfly, *Chlosyne lacinia*. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 48, p. 281-295, 2002.

VILLAS - BÔAS, S. et al. Mass spectrometry in metaboloma analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613-646, 2005.

WAHLBERG, N. The Phylogenetics and Biochemistry of Host-Plant Specialization in Melitaeine Butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). **Evolution**, v. 55, p. 522-537, 2001.

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

ZDERO, C. et al. Germacranolides, guaianolides and eudesmolides from *Greenmaniella resinosa*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 1999-2006, 1987.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**, v.171, p.1-14, 1990.

Apêndices

Apêndice A

Identificação dos sinais cromatográficos, estruturas químicas e espectros no UV e de massas obtidos durante as análises por CLAE-UV-EM. A numeração dos picos consta da Tabela 1 (item 4.1).

Sinal cromatográfico 1: ácido 3-*O-E*-cafeoilquínico

Figura 11: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 1. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 2: ácido 4-*O-E*-cafeoilquínico

Figura 12: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 2. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 3: ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico

Figura 13: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 3. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 4: ácido 4-*O-E*-feruloilquínico

Figura 14: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 4. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 5: ácido 4,5-*O-E*-feruloilcafeoilquínico

Figura 15: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 5. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 6: mono-*O*-cafeoilxose

Figura 16: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 6. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 7: luteolina-7-O-glicuronil

Figura 17: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 7. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 8: ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico

Figura 18: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 8. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 9: apigenina-7-*O*-glicuronil

Figura 19: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 9. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 10: crisoeriol-7-O-glicuronil

Figura 20: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 10. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 11: ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico

Figura 21: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 11. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 12: 4 β ,10 α -diidroxi-3-oxo-8 β -isobutiriloigualaia-11 (13)-en-6,12-olido

Figura 22: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 12. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 13: tagitinina A

Figura 23: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 13. Espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 14: tagitinina B

Figura 24: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 14. Espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 15: acacetina-7-O-glicuronil

Figura 25: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 15. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Sinal cromatográfico 16: tagitinina C

Figura 26: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 16. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 17: 1 α -hidroxitirofundina-3-O-metil-éter

Figura 27: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 17. Espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 18: Piptocarpina A

Figura 28: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 18. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 19: 2 β -metoxidesoxitagitinina B

Figura 29: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 19. Espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 20: Piptocarpina A esterificada com acetato

Figura 30: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 20. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 21: piptocarpina B

Figura 31: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 21. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.

Sinal cromatográfico 22: 3',4'-dimetoxiluteolina

Figura 32: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 22. Espectro no UV e espectros de massas no modo de ionização negativo (acima) e positivo (abaixo).

Pico cromatográfico 23: apigenina

Figura 33: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 23. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.

Pico cromatográfico 24: acacetina

Figura 34: Identificação e estrutura química do sinal cromatográfico 24. Espectro no UV e espectro de massas no modo de ionização positivo.