UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Tamy Kenner Maro Stringer

**Estudo metabolômico de espécies invasoras de Asteraceae
visando a descoberta de substâncias ativas contra a praga
agrícola *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae)**

Ribeirão Preto

2019

Tamy Kenner Maro Stringer

**Estudo metabolômico de espécies invasoras de Asteraceae
visando a descoberta de substâncias ativas contra a praga
agrícola *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof.^o Dr.^o Leonardo Gobbo
Neto

Ribeirão Preto

2019

<p>Maro Stringer, T.K.</p>	<p>Estudo metabolômico de espécies invasoras de Asteraceae visando a descoberta de substâncias ativas contra a praga agrícola <i>Chlosyne lacinia</i> Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae)</p>	<p>Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca</p>	<p>MESTRADO</p> <p>FCFRPUSP</p> <p>2019</p>
--------------------------------	--	---	---

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.

Maro Stringer, Tamy Kenner

Estudo metabolômico de espécies invasoras de Asteraceae visando a descoberta de substâncias ativas contra a praga agrícola *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae).
Ribeirão Preto, 2019.

131 p.; 30cm.

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. Herbivoria. 2. Metabolômica. 3. Ecologia química. 4.
Lepidoptera. 5. Química de Produtos Naturais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Tamy Kenner Maro Stringer

Título do trabalho: Estudo metabólico de espécies invasoras de Asteraceae visando a descoberta de substâncias ativas contra a praga agrícola *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae)

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe e meu esposo, por me darem força e apoio durante toda a minha jornada. Agradecimentos especiais ao meu finado pai, que sempre me motivou a seguir em frente.

Ao meu orientador, professor doutor Leonardo Gobbo Neto, pelas orientações e pela oportunidade acadêmica.

Aos colegas de trabalho por sempre darem dicas muito úteis e trazerem sorrisos nos dias alegres e nos dias difíceis. Agradecimentos em especial à Marcela, Camila, Paula, Danielle, Maria Eduarda, e Olakunle.

Aos funcionários e técnicos do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e do Laboratório de Farmacognosia por toda a colaboração e boa vontade em ajudar. Agradecimentos especiais ao Tomáz e ao Mário.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo por minha formação durante a graduação e pela oportunidade na pós-graduação.

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

“Valeu à pena? Tudo vale à pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”

Fernando Pessoa

RESUMO

STRINGER, T. K. M., **Estudo metabolômico de espécies invasoras de Asteraceae visando a descoberta de substâncias ativas contra a praga agrícola *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae)**. 2019. 131f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Asteraceae constitui uma família vegetal cujas espécies possuem notável resistência à herbivoria, o que se deve grandemente à produção de metabólitos secundários deterrentes. A lagarta da borboleta *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae), conhecida como "lagarta-do-girassol", uma importante praga de lavoura, embora utilize-se de forma quase exclusiva de plantas pertencentes à família Asteraceae como hospedeiras, também pode demonstrar comportamentos de dissuasão alimentar perante determinadas espécies desta família vegetal. Visando uma melhor elucidação da interação eco-química entre a lagarta-do-girassol e Asteraceae, foram realizados ensaios de performances alimentares das lagartas de *C. lacinia* mediante dietas com folhas de sete distintas espécies da família em questão. A partir das impressões digitais metabólicas e de métodos estatísticos e de mineração de dados, foram identificadas substâncias potencialmente ativas *in silico* presentes nas espécies *Emilia fosbergii* e *Vernonia polyanthes*, as que induziram as piores performances nas lagartas e taxas de 100% de mortalidade. Em *E. fosbergii*, as mortes ocorreram no primeiro estágio de desenvolvimento, logo após a eclosão dos ovos, e, para *V. polyanthes*, isto ocorreu a partir do 2º estágio de desenvolvimento. Dentre os 19 metabólitos identificados, destacam-se como possíveis deterrentes e capazes de ocasionar as altas taxas de mortalidade, flavonoides, lactonas sesquiterpênicas e alcaloides pirrolizidínicos. Para as demais espécies vegetais, exceto em *Tridax procumbens*, utilizado como controle positivo, o crescimento de *C. lacinia* se mostrou mais lento, o que foi expresso através de um maior número de *instares* até que o inseto atingisse a fase adulta. Possivelmente, *C. lacinia* detém mecanismos capazes de lidar com as propriedades deterrentes e/ou tóxicas relativas aos metabólitos das espécies que induziram retardo em seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Herbivoria, Metabolômica, Ecologia química, Lepidoptera, Química de Produtos Naturais.

ABSTRACT

STRINGER, T. K. M., **Metabolomic study of invasive species of Asteraceae, aiming at discovering active substances against the agricultural plague *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae)**. 2019. 131f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Asteraceae is a plant family whose species possess remarkable resistance to herbivory, which is largely due to the production of deterrent secondary metabolites. The butterfly caterpillar *Chlosyne Lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae), known as "Sunflower Caterpillar", which is an important crop pest and whose host plants are almost exclusively species of Asteraceae, may present a deterrence behavior to certain species of this plant family. Aiming at a better elucidation of the eco-chemical interaction between the sunflower Caterpillar and Asteraceae, assays of *C. lacinia* caterpillars feeding performances were conducted using diets composed by the leaves of seven distinct species of the family in question. The potentially *in silico* active substances present in the species *Emilia fosbergii* and *Vernonia polyanthes*, which induced the worst performances in the caterpillars and caused 100% of mortality, were identified from the metabolic fingerprints, statistical methods and data mining. For *E. Fosbergii*, the deaths occurred in the first stage of development, shortly after the eggs hatched, and, for *V. Polyanthes*, it occurred in the second stage of development. Among the 19 identified metabolites, those which stand out as possible deterrents and capable of causing the high mortality rates are flavonoids, sesquiterpene lactones and pyrrolizidine alkaloids. For the other plant species, except *Tridax procumbens*, that was used as a positive control, the growth of *C. Lacinia* was slower, which was expressed by a higher number of instars until the insect reached adulthood. Possibly, *C. Lacinia* holds mechanisms that makes it capable of dealing with the deterrent and/or toxic properties related to the metabolites of the species that induced delay in their development.

Key-words: Herbivory, Metabolomics, Chemical Ecology, Lepidoptera, Chemistry of Natural Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de desenvolvimento da espécie <i>C. lacinia</i> . (Fotos: Tamy Kenner Maro Stringer).....	3
Figura 2: Fluxograma de estudos metabolômicos do tipo <i>Untargeted</i>	4
Figura 3: Aglomerado de lagartas encontrado em campo na espécie vegetal <i>T. procumbens</i> (Fotos: Tamy Kenner Maro Stringer).	11
Figura 4: Fluxograma resumido do trabalho.....	20
Figura 5: <i>E. fosbergii</i> . (Foto: Tamy Kenner Maro Stringer).....	21
Figura 6: <i>V. polyanthes</i> (Fotos: Maria Elvira Poleti e Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto)	22
Figura 7: Crescimento de <i>C. lacinia</i> mensurado a partir do 2º instar ao longo do processo de metamorfose. À esquerda, são representadas as espécies vegetais e, à direita, seus respectivos instares: <i>V. polyanthes</i> (Vp – II); <i>C. japonica</i> (Cj – II, Cj – III, Cj – IV, Cj – V, Cj – VI); <i>P. hystrophorus</i> (Ph – II, Ph – III, Ph – IV, Ph – V); <i>B. sulphurea</i> (Bs – II, Bs – III, - Bs – IV, - Bs – V); <i>T. diversifolia</i> (Td – II, Td – III, Td IV); <i>T. procumbens</i> (Tp – II, Tp – III, Tp – IV). As barras de erro indicam uma variação percentual de $\pm 5\%$	24
Figura 8: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de <i>C. lacinia</i> alimentada com <i>T. procumbens</i> (controle experimental) ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.37.	27
Figura 9: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de <i>C. lacinia</i> alimentada com <i>T. diversifolia</i> ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.37.	28
Figura 10: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de <i>C. lacinia</i> em <i>C. japonica</i> ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da	

probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.94..... 29

Figura 11: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *P. hystrophorus* ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.66..... 30

Figura 12: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *B. sulphurea*. ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.75..... 31

Figura 13: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *V. polyanthes* ao longo de 10 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.031 (valor estatisticamente significativo)..... 32

Figura 14: Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *E. fosbergii* ao longo de 5 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.4..... 33

Figura 15: Impressão digital metabólica (*metabolite fingerprint*) da espécie *E. fosbergii* expressa pelo cromatograma no modo positivo de ionização (POS) e no modo negativo de ionização (NEG)..... 35

Figura 16: Impressão digital metabólica (*metabolite fingerprint*) da espécie *V. polyanthes* expressa pelo cromatograma no modo positivo de ionização (POS) e no modo negativo de ionização (NEG)..... 36

Figura 17: PCA *score plot* referente às componentes 1 e 4. Foram obtidos para este método os valores de 0,623 para R^2X e de -0,331 para Q^2 . A contribuição de R^2X [1] foi de 0,233, e, de R^2X [4], 0,138. Elipse: Hotelling's T2 (95%).. 37

Figura 18: PLS-DA *score plot* utilizando como classes a espécie *E. fosbergii* e as demais, com exceção de *V. polyanthes*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,655; 1; e 0,979. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,178, e, de R^2X [2], 0,249. Elipse: Hotelling's T2 (95%)..... 38

Figura 19: PLS-DA *score plot* utilizando como classes a espécie *V. polyanthes* e as demais, com exceção de *E. fosbergii*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,649; 1; e 0,983. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,263, e, de R^2X [2], 0,192. Elipse: Hotelling's T2 (95%)..... 39

Figura 20: *Loading plot* dos 100 íons mais importantes para a projeção do modelo referente a *E. fosbergii*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,655; 1; e 0,979. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,178; e, de R^2X [2], 0,249. 39

Figura 21: *Loading plot* dos 100 íons mais importantes para a projeção do modelo referente a *V. polyanthes*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,649; 1; e 0,983. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,263; e, de R^2X [2], 0,192..... 40

Figura 22: VIP *plot* obtido através do método PLS-DA para a espécie *E. fosbergii*..... 41

Figura 23: VIP *plot* obtido através do método PLS-DA para a espécie *V. polyanthes*..... 41

Figura 24: Representação estrutural dos ácidos clorogênicos identificados nas amostras de espécies ativas. 53

Figura 25: Representação estrutural dos flavonoides identificados nas amostras de espécies ativas..... 56

Figura 26: Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas identificadas nas amostras da espécie ativa *V. polyanthes*. 58

Figura 27: Possível fragmento referente ao pico 16. 59

Figura 28: Fragmentos do alcaloide senquirquina segundo o espectro de massas obtido.	59
Figura 29: Alcaloide pirrolizidínico identificado nas amostras de espécies ativas.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies utilizadas no trabalho e as respectivas tribos às quais pertencem.	11
Tabela 2: Parâmetros usados pelo <i>software</i> MzMine no pré-processamento dos dados no modo positivo obtidos pela análise em UHPLC-ESI-MS (Orbitrap). .	17
Tabela 3: Parâmetros usados pelo <i>software</i> MzMine no pré-processamento dos dados no modo negativo obtidos pela análise em UHPLC-ESI-MS (Orbitrap).	18
Tabela 4: Comportamento alimentar de <i>C. lacinia</i> frente às sete espécies vegetais seguido ou não de morte.	23
Tabela 5: Taxas de mortalidade de <i>C. lacinia</i> para as sete espécies vegetais e número de estágios de desenvolvimento atingidos até a pupação.	24
Tabela 6: Comparação entre as médias de mortalidade das lagartas entre o grupo controle e grupos experimentais. Teste-T realizado com duas caudas para amostras independentes entre si (alimentação diferenciada). Foram consideradas amostras estatisticamente significativas aquelas com valores de $P < 0.05$ (sublinhadas na tabela).	24
Tabela 7: 30 íons referentes às substâncias discriminantes apontadas com os maiores valores de VIP para <i>E. fosbergii</i>	41
Tabela 8: 30 íons referentes às substâncias discriminantes apontadas com os maiores valores de VIP para <i>V. polyanthes</i>	43
Tabela 9: Metabólitos identificados para <i>V. polyanthes</i> por desreplicação.	45
Tabela 10: Metabólitos identificados para <i>E. fosbergii</i> por desreplicação.	50
Tabela 11: Metabólitos identificados para a espécie <i>V. polyanthes</i> e seus respectivos valores de VIP nos modos positivo e negativo.	61
Tabela 12: Metabólitos identificados para a espécie <i>E. fosbergii</i> e seus respectivos valores de VIP nos modos positivo e negativo.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	<i>All Ion Fragmentation</i>
AP	Alcaloide pirrolizidínico
ESI	<i>Eletrospray ionization</i>
LST	Lactona sesquiterpênica
MS	Espectrômetro de massas
m/z	Razão massa/carga
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
Q^2	<i>Goodness of prediction</i>
R^2X	<i>Goodness of fit</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
tR	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
VIP	<i>Variable Influence on Projection</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Asteraceae	1
1.2	Insetos-praga e <i>Chlosyne lacinia</i> Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae, Melitaeini)	2
1.3	Metabolômica e interação inseto-planta	3
1.4	Análise metabolômica <i>in silico</i> para processamento de dados gerados por LC-MS	3
2	OBJETIVOS	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Material vegetal	11
3.2	Insetos	12
3.2.1	Coleta em campo	12
3.2.2	Cultivo em laboratório	12
3.2.2.1	Cultivo da fase larval	13
3.2.2.2	Cultivo na fase adulta	13
3.3	Ensaio para avaliação da performance de lagartas de <i>C. lacinia</i> nas plantas selecionadas	14
3.3.1	Avaliação da sobrevivência das lagartas	14
3.4	Análises metabolômicas	15
3.4.1	Equipamentos e metodologia analítica em UHPLC-ESI-MS (Orbitrap™)	15
3.4.2	Preparo dos extratos vegetais	15
3.5	Pré-tratamento dos dados	16
3.6	Análise estatística e mineração de dados (Análise de Correlação <i>in silico</i>)	19

3.7	Análise qualitativa	19
3.7.1	Desreplicação para identificação dos metabólitos discriminantes...	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Ensaio para avaliação da performance de lagartas de <i>C. lacinia</i> nas plantas selecionadas	21
4.1.1	Piores performances de <i>C. lacinia</i>	21
4.1.2	Demais performances de <i>C. lacinia</i>	23
4.2	Avaliação da sobrevivência das lagartas (Teste-T e estimador de Kaplan-Meier)	25
4.3	Análises metabolômicas	34
4.3.1	Pré-tratamento dos dados e obtenção das impressões digitais metabólicas	34
4.3.2	Análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas.....	37
4.3.3	Análises estatísticas multivariadas supervisionadas	37
4.4	Análise qualitativa	44
4.4.1	Identificação das substâncias para as espécies ativas (<i>E. fosbergii</i> e <i>V. polyanthes</i>)	44
4.4.1.1	Ácidos clorogênicos.....	52
4.4.1.2	Flavonoides	54
4.4.1.3	Lactonas sesquiterpênicas	57
4.4.1.4	Alcaloides pirrolizidínicos e <i>N</i> -óxido.....	58
4.5	Contribuição dos valores de VIP na identificação dos metabólitos	60
4.6	Metabólitos identificados potencialmente ativos e sua relação com os ensaios de performance	66
4.6.1	Metabólitos das espécies ativas (<i>E. fosbergii</i> e <i>V. polyanthes</i>) ..	66

4.6.2	Metabólitos das demais espécies vegetais	68
4.7	Possíveis mecanismos de defesa de <i>C. lacinia</i>	70
5	CONCLUSÃO	72
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	APÊNDICES	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asteraceae

Asteraceae, pertencente à ordem Asterales, é uma das maiores famílias vegetais e supostamente a mais abrangente dentre as angiospermas. Abriga cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1994) e aproximadamente 1.700 gêneros e uma estimativa total de 30.000 espécies, (ANDERBERG et al., 2007; FUNK et al., 2009). Exemplares desta família distribuem-se por todos os continentes, com exceção da Antártida, fazendo-se presentes em regiões tropicais, subtropicais e de clima temperado (FUNK et al., 2005, 2009).

É possível que os grandes êxitos evolutivos de Asteraceae se devam à eficiência de seus mecanismos de polinização e dispersão, bem como à presença de importantes metabólitos secundários que lhes conferem diversos benefícios adaptativos. A paleo-poliploidização e duplicação de genomas, por sua vez, são eventos potencialmente influentes na alta diversidade presente nesta família (TANK et al., 2015; PANERO; CROZIER, 2016).

Os principais metabólitos secundários ocorrentes em membros de Asteraceae são poliacetilenos, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, flavonoides, cumarinas e polifenóis derivados do ácido clorogênico (EMERENCIANO et al., 1998; BOLINA et al., 2009). Várias destas substâncias apresentam atividades biológicas, ecológicas e farmacológicas. Destacam-se derivados do ácido chiquímico, tais como flavonóides e ácidos clorogênicos, devido à relação com o estresse metabólico, ação alelopática e proteção contra pragas e doenças (CASTRO et al., 2004), e terpenoides, como diterpenos, e as lactonas sesquiterpênicas (LSTs), as quais apresentam propriedades tóxicas e de dissuasão alimentar para herbívoros (SCHMIDT, 1999; DA COSTA et al., 2005). Em certos casos, em Lepidoptera, as LSTs e alguns flavonóides são capazes de reduzir as taxas de crescimento e de sobrevivência e também o peso da pupa (PASSREITER e ISMAN, 1997; MARTUCCI et al., 2016). Desta forma, o sucesso evolutivo de Asteraceae, dentre outros fatores, pode estar relacionado ao desenvolvimento desse sistema químico de defesa constituído pelos metabólitos secundários.

A família Asteraceae possui ainda importante valor econômico, desde seu emprego no ramo ornamental à produção industrial. Algumas de suas espécies são utilizadas como alimento (*Lactuca sativa* L., alface), fonte de óleos e néctares (*Helianthus annuus* L., girassol), matérias-primas para produtos industriais como cosméticos, corantes, praguicidas, medicamentos, dentre outros (ANDERBERG et al., 2007; SIMPSON, 2009).

1.2 Insetos-praga e *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae, Melitaeini)

As lagartas de lepidópteros (borboletas), de modo geral, são consideradas uma praga quando presentes em altas densidades populacionais nas lavouras (BENTANCOURT e SCATONI, 1996).

Na literatura, o inseto-praga da espécie *Chlosyne lacinia* Geyer (Lepidoptera: Nymphalidae, Melitaeini) também conhecido como “lagarta-do-girassol”, tem se destacado como desfolhador em distintas culturas vegetais no Brasil nas últimas duas décadas, devido a alterações no manejo das lavouras, que incluem o uso crescente de praguicidas, propiciando um desequilíbrio em todo o agroecossistema (PANIZZUCCI et al., 2012; MOSCARDI et al., 2012). As lagartas de *C. lacinia* alimentam-se de diferentes plantas, especialmente aquelas da família Asteraceae (AMBROSIO et al., 2008; LOURENÇÃO e UNGARO, 1982; CUNNINGHAM e ZALUCKY, 2014). Ainda assim, algumas plantas dessa família vegetal podem conter metabólitos secundários tóxicos para estas lagartas, conforme evidenciado pelo trabalho de Martucci e Gobbo-Neto (2016), que demonstrou que quando induzida a se alimentar de folhas da espécie *Vernonia polyanthes* Less, *C. lacinia* apresentou altas taxas de mortalidade (TING et al., 2002, MARTUCCI e GOBBO-NETO, 2016), reforçando o potencial de resistência à herbivoria em Asteraceae.

Figura 1. Estágios de desenvolvimento da espécie *C. lacinia*. (Fotos: Tamy Kenner Maro Stringer).

1.3 Metabolômica e interação inseto-planta

O “metaboloma” se caracteriza pelo conjunto total dos metabólitos que um organismo é capaz de sintetizar em determinado momento e abrange produtos naturais complexos e compostos químicos diversos, consistindo no produto final da expressão gênica que define o fenótipo químico da célula ou tecido (SUMNER et al., 2003; VILLAS-BOAS et al., 2005a). O acesso do metaboloma em um dado sistema biológico por meio de uma análise sem viés, com o emprego de métodos quantitativos e/ou qualitativos foi cunhado como “metabolômica” (AGIN et al. 2016). Por outro lado, as técnicas metabolômicas aplicadas a estudos ecológicos foram cunhadas dentro do campo da ecometabolômica (FIEHN 2002; SCHRIPSEMA 2010), a qual permite uma análise mais profunda dos aspectos bioquímicos e das implicações ecológicas da interação inseto-planta. A determinação do metaboloma, porém, não é uma

tarefa simples devido ao fato de a maior parte dos métodos de análise de que se pode lançar mão atualmente não permite a determinação de maneira simultânea de todos os metabólitos sintetizados por um dado organismo (FIEHN, 2001; VILLAS-BÔAS et al., 2005b; WOLFENDER et al., 2015). Para se realizar uma análise metabolômica, portanto, duas abordagens são possíveis: (i) *Targeted metabolomics*, a qual objetiva identificar e quantificar na amostra um conjunto de metabólitos pré-definidos, permitindo estudar uma ou mais vias metabólicas de interesse; e (ii) *Untargeted*, a qual visa a detecção simultânea do conjunto global de metabólitos de um sistema biológico em tempo-real, sem conhecimento prévio da identidade das substâncias, permitindo uma avaliação de diferentes perfis metabolômicos (VILLAS-BÔAS et al., 2005; PATTI et al., 2012; ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; GORROCHATEGUI et al., 2016; YI et al., 2016).

Figura 2. Fluxograma de estudos metabolômicos do tipo *Untargeted*.

Ambas as abordagens dependem de técnicas cromatográficas de separação associadas a um detector espectroscópico ou espectrométrico,

sendo as mais utilizadas atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência ou de ultra eficiência (HPLC ou UHPLC) acoplada a detectores de espectrometria de massas (MS) ou de ressonância magnética nuclear (NMR), e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (VILLAS-BOAS et al., 2005b; GOBBO-NETO, 2007; MORITZ e JOHANSSON, 2008; VAN DER KOOY et al., 2009; FERREIRA, 2010; WOLFENDER et al., 2010; CHAGAS-PAULA, 2013).

Como ilustrado na figura 2, a partir dos dados que atravessaram o pré-tratamento, realiza-se a mineração dos dados (*data mining*), por meio de análises estatísticas multivariadas, valendo-se de técnicas supervisionadas, como o PLS (*Partial Least Squares*) e o OPLS, (*Orthogonal Partial Least Squares*) ou não-supervisionadas, como o PCA, (*Principal Components Analysis*) e HCA, (*Hierarchical Cluster Analysis*) (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; FERREIRA et al., 2015). A análise conduzida através das técnicas não-supervisionadas constituem um método de análise exploratória de dados que objetiva resumir a complexidade dos achados referentes à metabolômica, desconsiderando o tipo ou classe da amostra; por outro lado, as técnicas supervisionadas são norteadas pelo prévio estabelecimento de classes para as amostras, de modo a se observar um caráter de interesse e permitindo, em adição, a construção de modelos preditivos (ERIKSSON et al., 2013; ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; FERREIRA, 2015).

Em termos de diferenças analíticas e de objetivos, a análise *targeted* refere-se à quantificação exata dos metabólitos-alvos, devendo ser empregados padrões para a identificação dos sinais metabólito-específicos de modo preciso e acurado (AGIN et al., 2016). É uma análise dirigida para responder uma dada hipótese que norteia a investigação de uma (s) via (s) de interesse (PATTI et al., 2013; AGIN et al., 2016). De modo análogo, a análise *untargeted* é limitada a uma interpretação qualitativa ou semi-quantitativa de um sistema biológico, dependendo da existência de bancos de dados complexos em que muitas vezes a maioria dos metabólitos ainda não está anotada, levando à eventual incompleta caracterização do perfil metabólico da amostra, contudo esta é uma abordagem que abre caminhos para a caracterização de substâncias e de novas vias metabólicas (AGIN et al., 2016).

As técnicas empregadas nas diferentes abordagens da análise metabolômica proporcionaram uma nova maneira de identificar metabólitos de interesse durante interações químicas intra ou interespecíficas (KUHLISCH e POHNERT, 2015). Nesse contexto, a interação-inseto planta se mostra detentora de grande importância, pois é estimado que uma única planta possa possuir entre 5000-25000 metabólitos, sendo que muitas espécies podem apresentar ainda um conjunto único de metabólitos secundários (MAAG et al., 2015). Além disso, as plantas podem responder a uma vastidão de estressores simplesmente pela adaptação diferencial de seu repertório metabólico, principalmente para proteção contra herbivoria (KUHLISCH & POHNERT, 2015). Contudo, embora os metabolomas de insetos sejam muito menos complexos, muitas espécies se especializaram em sequestrar e/ou modificar metabólitos secundários tóxicos produzidos pelas plantas em seu próprio favor, tornando seus metabolomas mais intrincados (MAAG et al., 2015).

Em contrapartida, os metabolomas dos insetos também são afetados pelos metabólitos produzidos por suas plantas hospedeiras, bem como por fatores abióticos. Como o número de metabólitos primários e secundários ingeridos por um inseto em fase larval é desconhecido e é muito difícil quantificar o número de cada metabólito dentre uma gama de substâncias presentes em um organismo completo, o efeito da dieta sobre a progressão larval é ainda uma área emergente no campo da ecologia química e poderá ser muito importante para a detecção e identificação de metabólitos-chaves para o controle biológico, cujos efeitos no desenvolvimento larval dos insetos seriam dificilmente contornados pela seleção natural (RIACH et al., 2019). Dessa maneira, os estudos de metabolômica comparativa podem ser a chave para melhor compreender as complexas relações inseto-planta (KUHLISCH & POHNERT, 2015) e para prospectar informações químicas valiosas para aplicação agroindustrial.

1.4 Análise metabolômica *in silico* para processamento de dados gerados por LC-MS

Em virtude do grande número de sinais químicos detectados, a análise metabolômica não pode ser realizada manualmente. Para isso, devem ser utilizados *softwares* e algoritmos adequados que permitam o processamento dos dados em larga-escala (BERG et al., 2013). O primeiro passo para a análise dos dados consiste no pré-processamento dos arquivos gerados pelo cromatógrafo acoplado à espectrometria de massas. Os arquivos devem ser convertidos em matrizes de dados que podem sumarizar a presença/ausência de picos (formato binário), bem como as abundâncias relativas ou absolutas dos metabólitos.

Uma vez que o dado é convertido a um formato adequado, o próximo passo é identificar os valores ausentes no conjunto de dados (*missing values*) (CONSIDINE et al., 2017), ou seja, valores de relação m/z referentes a certos compostos que não podem ser identificados/quantificados em algumas amostras, sendo originados frequentemente por questões biológicas e/ou técnicas durante o experimento, como por exemplo a ionização e/ou derivatização incompleta da molécula (WEI et al., 2018).

Para a remoção de ruídos experimentais gerados pela manipulação interpessoal e a indesejada variação técnica experimental podem ser utilizados métodos de pré-tratamento da amostra, como: normalização, escalonamento, centralização e transformação de dados (CONSIDINE et al., 2017). Como o cenário de metabólitos presentes em um dado sistema biológico é caracterizado pela ocorrência de concentrações desiguais de diversos metabólitos, os métodos escolhidos para o pré-tratamento objetivam corrigir essas diferenças para tornar as concentrações desiguais mais homogêneas e, assim, permitir a visualização da mensagem biológica de modo enfático e interpretável (VAN DEN BERG et al., 2006).

O pós-processamento é caracterizado pela detecção de características ou picos referentes a cada metabólito, seguido do alinhamento dos picos e ainda passos adicionais optativos para filtragem de sinais químicos como o preenchimento de *gaps* entre cromatogramas (BERG et al., 2013) e a remoção de ruídos experimentais utilizando algoritmos de seleção de picos. Os picos

são alinhados entre as amostras e corrigidos com base nos seus tempos de retenção, gerando uma tabela final que integra os dados de intensidade de cada pico por amostra (BENTON et al., 2010).

Em virtude dos diferentes métodos de calibração utilizados pelos fabricantes de espectômetros de massas, como pelo método de alternância temporária de fluxo, pode ocorrer a paralisação temporária da detecção do analito, resultando em *gaps* em uma faixa de relação m/z , o que leva a decomposição de um pico com boa resolução em diversos sub-picos, que confundem o processo de alinhamento de picos. Outro problema é que mesmo que o pico seja detectado corretamente, pode haver uma subestimação da relação m/z em virtude da ocorrência do *gap*. A propagação do erro é facilmente exacerbada quando somadas as variações das derivas dos tempos de retenção entre as amostras, levando ao aumento de *gaps* em um único pico. Com isso, aumentam-se as chances de detecção de picos falso-positivos e falso-negativos, bem como a uma determinação inacurada das intensidades dos picos (BENTON et al., 2010). Por esses motivos, o preenchimento dos *gaps* e a remoção dos ruídos são fundamentais para as etapas subsequentes da análise.

O tratamento estatístico dos dados gerados pode ser dividido em análise univariada e multivariada. A análise univariada visa analisar cada composto independentemente em função de um determinado fator, enquanto a análise multivariada processa totalmente os perfis químicos das amostras, buscando padrões entre eles, o que pode revelar associações entre vias metabólicas relacionadas às vias de biossíntese, por exemplo. Além disso, uma das vantagens da análise multivariada é determinar a variação intra e interespecífica das amostras por meio da redução de espaço amostral (i.e. análise de componente principal), permitindo observar a origem da variabilidade dos perfis químicos das amostras em razão da distribuição diferencial dos diversos metabólitos compartilhados ou únicos de cada amostra.

As etapas finais de análise dos dados consistem em anotar os picos filtrados alinhando-os contra referências depositadas em bancos de dados dedicados à identificação putativa dos metabólitos e com dados da literatura, ou seja, os estudos metabolômicos preferencialmente lançam mão da

ferramenta de desreplicação, a fim de se identificar as substâncias presentes nas amostras analisadas sem que se precise isolar as substâncias (SMITH et al., 2005; CROTTI et al., 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; BERG et al., 2013; MARTUCCI et al., 2014; WANG et al., 2014; BANERJEE et al., 2015).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi identificar metabólitos secundários de Asteraceae capazes de inibir ou limitar o desenvolvimento de *C. lacinia* utilizando, para isso, ensaios de performance das lagartas de *C. lacinia* associados a estudos *in silico* das impressões digitais metabólicas de sete espécies da família Asteraceae.

Desta maneira, os objetivos específicos do trabalho foram:

- a. Avaliar a performance de *C. lacinia* mediante à dieta com sete diferentes espécies de plantas da família Asteraceae;
- b. Obter as impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprint*) dos extratos das plantas ativas por meio de *untargeted metabolomics* empregando UHPLC-UV(DAD)-ESI-MS (Orbitrap™);
- c. Comparar, usando técnicas estatísticas e de mineração de dados, os resultados obtidos nos ensaios de performance com as impressões digitais metabólicas das plantas visando evidenciar as substâncias discriminantes para as piores performances dos insetos;
- d. Identificar as substâncias discriminantes, ativas *in silico*, comparando os picos de relação *m/z* em bancos de dados e por meio de revisões bibliográficas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As plantas escolhidas foram mantidas em canteiros, em local adjacente aos laboratórios do NPPNS da FCFRP, para possibilitar a coleta de folhas frescas para realização dos ensaios metabolômicos e também alimentação e criação das lagartas de *C. lacinia*.

As sete espécies vegetais de Asteraceae selecionadas para cultivo foram: *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. (Coreopsideae), *Crepis japonica* (L.) Benth. (Cichorieae), *Emilia fosbergii* Nicolson (Senecioneae), *Parthenium hysterophorus* L. (Heliantheae), *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Heliantheae), *Vernonia polyanthes* Less. (Vernonieae) e *Tridax procumbens* L. (Millerieae), sendo a última também utilizada como controle positivo para o crescimento das lagartas.

As espécies utilizadas no estudo foram selecionadas, de modo geral, a partir de tribos distintas, a fim de se buscar maior variedade de metabólitos potencialmente capazes de induzir comportamentos alimentares diversos das lagartas.

Tabela 1: Espécies utilizadas no trabalho e as respectivas tribos às quais pertencem.

Espécie	Tribo
<i>B. sulphurea</i>	Coreopsideae; (Less. & Lindl., 1829)
<i>C. japonica</i>	Cichorieae (Lam. & DC., 1806)
<i>E. fosbergii</i>	Senecioneae (Bentham, 1873)
<i>P. hysterophorus</i>	Heliantheae (Cassini, 1819)
<i>T. diversifolia</i>	Heliantheae (Cassini, 1819)
<i>T. procumbens</i>	Millerieae (Bentham, 1873)
<i>V. polyanthes</i>	Vernonieae (Cassini 1817, 1819)

3.2 Insetos

3.2.1 Coleta em campo

Foram coletadas lagartas e aglomerados de ovos de *C. lacinia* durante períodos de infestação de *T. diversifolia* e *T. procumbens*, em locais de ocorrência das plantas hospedeiras no campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os ovos e as lagartas foram trazidos imediatamente após a coleta para o laboratório, onde as lagartas foram cultivadas e alimentadas com as folhas das respectivas espécies a partir das quais foram coletadas em campo.

Figura 3. Aglomerado de lagartas encontrado em campo na espécie vegetal *T. procumbens* (Fotos: Tamy Kenner Maro Stringer).

3.2.2. Cultivo em laboratório

O cultivo de *C. lacinia* foi realizado seguindo a metodologia de Drummond III e col. (1970), na qual os ovos eram gentilmente pincelados sobre as superfícies das faces abaxiais das folhas do material vegetal que, por sua vez,

eram armazenadas em caixas de plástico. Para evitar ruídos experimentais no metabolismo dos insetos em decorrência da não padronização dos ciclos de claro e escuro, a sala na qual as caixas com os insetos em fase de crescimento foram estocadas foi climatizada para manutenção de temperatura na faixa de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e o fotoperíodo foi programado para um ciclo de 16h dia x 8h noite.

3.2.2.1 Cultivo da fase larval

Os ovos e lagartas de *C. lacinia* obtidos a partir da coleta em campo foram cultivados até completarem a metamorfose e atingirem a fase adulta.

Os grupamentos de ovos depositados pelas borboletas foram coletados com auxílio de uma espátula e postos para eclodir na face abaxial de folhas das espécies selecionadas de Asteraceae. As folhas utilizadas na dieta das lagartas foram cortadas das respectivas espécies vegetais no ponto de inserção do pecíolo no caule da planta, imediatamente antes de sua utilização. As folhas que continham os ovos eram acondicionadas em caixas plásticas transparentes (60cm largura x 40cm profundidade x 40cm altura) cuja tampa foi substituída por um tecido de tule para permitir a aeração do sistema, de modo que houvesse uma folha com um grupamento de ovos por caixa, sendo mantidos a umidade e turgor por meio da inserção dos pecíolos recém cortados em espuma fenólica (espuma floral) logo após a folha ser cortada da planta. Até a pupação, foram adicionadas, diariamente, folhas frescas das espécies vegetais, e, os detritos, removidos.

As folhas destinadas à dieta das lagartas foram repostas de acordo com a necessidade e com o desenvolvimento dos insetos após a eclosão e início da fase de alimentação.

3.2.2.2 Cultivo da fase adulta

As pupas foram transferidas para novas caixas de cultivo, enquanto as lagartas remanescentes eram postas em outras caixas para que a pupação fosse completada e não afetasse aquelas já finalizadas pelas outras lagartas. Após a metamorfose, os insetos adultos permaneceram em caixas plásticas

semelhantes àquelas do cultivo, na proporção de aproximadamente 10 machos e 10 fêmeas por caixa. A diferenciação de gênero foi determinada através da observação, sob estereomicroscópio, da morfologia da cutícula externa dos segmentos terminais das pupas, ou seja, próximos ao ânus (UNDERWOOD, 1994; GENC, 2005).

A alimentação dos insetos adultos consistiu em uma solução de mel em água (1:20), acondicionada em frascos de vidro estéreis contendo roletes de algodão hidrofílico imersos na solução com uma extremidade exteriorizada ao frasco. As borboletas alimentavam-se na superfície do algodão, cuja umidade com a solução água-mel era mantida por capilaridade.

3.3. Ensaio para avaliação da performance de lagartas de *C. lacinia* nas plantas selecionadas

Para estes ensaios, as lagartas foram cultivadas da mesma forma que o descrito no item 3.2.2.1, variando-se apenas as espécies vegetais da dieta a fim de se obter dados sobre a viabilidade de *C. lacinia* nas diferentes espécies.

As taxas de crescimento e de mortalidade foram utilizadas para a avaliação do desempenho de *C. lacinia* alimentado com as folhas das sete espécies selecionadas de Asteraceae. A determinação da taxa de mortalidade consistiu na porcentagem de larvas mortas ao longo da alimentação, enquanto que a taxa de crescimento foi obtida através do peso médio das larvas ($n = 10$), as quais foram pesadas a cada 4 dias, a partir do 2º *instar* de desenvolvimento.

A influência da dieta nas taxas de mortalidade foi avaliada através do teste-T com base nas médias das massas aferidas e no número médio de mortes ao longo do período de alimentação; e por meio do estimador de Kaplan-Meier, através das informações de indivíduos mortos no decorrer dos dias de tratamento.

3.3.1 Avaliação da sobrevivência das lagartas

A sobrevivência das lagartas foi representada pelo estimador não-paramétrico produto-limite Kaplan-Meier, incluso no pacote R *survival* versão

2.44-1.1 (THERNEAU & LUMLEY, 2019), através do qual foi possível realizar as análises de sobrevivência no decorrer dos dias a partir do número de lagartas mortas/dia durante o decorrer dos ensaios de performance.

3.4. Análises metabolômicas

3.4.1 Equipamentos e metodologia analítica em UHPLC-ESI-MS (Orbitrap™)

A metodologia analítica foi conduzida em concordância com aquela realizada por GALLON et al., 2018, através da qual se empregou uma coluna Kinetex™ Core-Shell (Phenomenex) XB-C18 1,7 μm (100 Å; 150 x 2,1 mm), cuja pré-coluna de proteção é formada pelo mesmo material; fase móvel constituída por água (A) e acetonitrila (B), acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v), a uma vazão de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ e com o seguinte gradiente de eluição: 0-2 minutos: 5% B 2-30 minutos: 5-100% B 30-34 minutos: 100% B 34-37 minutos: 100-5% B 37-40 minutos: 5% B. O N_2 utilizado como gás de secagem, colisão e fragmentação.

As análises das impressões digitais metabólicas foram realizadas em um sistema UHPLC-DAD-ESI-MS (Orbitrap™) (Thermo Scientific Exactive™, Thermo Scientific®), que consiste em cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC *Accele* 1250) e um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) com analisador tipo Orbitrap, utilizando simultaneamente os modos de ionização positivo e negativo. Utilizando esse sistema, foi realizada a detecção das massas dos íons formados por *electrospray* e a fragmentação de íons totais (AIF), que consiste na fragmentação de todos os íons presentes em determinado tempo de retenção.

3.4.2 Preparo dos extratos vegetais

Para a obtenção das impressões digitais metabólicas, uma massa de 10 mg de folhas previamente congeladas em N_2 líquido foi triturada para posterior extração em 1,0 mL de solução de MeOH- H_2O (7:3 v/v) em ultrassom por 15

minutos. Os extratos foram centrifugados e os sobrenadantes filtrados em membrana filtrante PTFE (0,22 μm) anteriormente à injeção do analito no equipamento.

3.5 Pré-tratamento dos dados

As impressões digitais dos extratos submetidos à análise proporcionaram arquivos .raw gerados pela plataforma de LC-MS e que foram convertidos para arquivos de extensão .mzXML utilizando o programa MSConvert (KESSNER et al., 2008), que é um tipo de arquivo universalmente aceito para facilitar o intercâmbio de informações de espectros de massas oriundos de diversos formatos brutos (.raw) derivados de diferentes formatos intrínsecos de cada empresa fabricante de um dado cromatógrafo (LIN et al., 2005). Na sequência, os arquivos .mzXML foram segregados em modo positivo e negativo e individualmente atravessaram o pré-processamento por meio do *software* MzMine™ (BMC Bioinformatics, Reino Unido), através do qual foram realizados o corte da linha de base, a deconvolução dos picos, o agrupamento dos isótopos e o alinhamento de cromatogramas. Os parâmetros utilizados pelo MzMine™ para o pré-tratamento dos dados nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente, estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Foi utilizada uma solução contendo o solvente das extrações (MeOH-H₂O 7:3 v/v) como branco. Através das análises obtidas pelo MzMine™, foi feita a exportação da matriz principal em forma de tabela em arquivo de extensão .csv, a partir da qual os picos do branco foram removidos, para posterior a centralização na média e escalonamento por Pareto para tratamento dos dados e análise estatísticas.

Para a visualização final e análise dos cromatogramas e espectros de massas obtidos, foram utilizados os *softwares* Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fischer Scientific ©) e MzMine™.

Tabela 2. Parâmetros usados pelo software MzMine no pré-processamento dos dados no modo positivo obtidos pela análise em UHPLC-ESI-MS (Orbitrap).

<i>Raw data methods/ Peak detection</i>	<u>Mass detection:</u> Scans: Retention Time: 0-40 min; MS level: MS1 Mass Detector: Exact Mass - Noise level= 1.0E7 <u>Chromatogram builder:</u> Scans: Retention Time: 0-40 min; MS level: MS1 Minimum time span (min)= 0,01; Minimum height = 3.0E7; m/z tolerance= 0,001 m/z or 4.0 ppm
<i>Peak list methods</i>	<u>Chromatogram deconvolution:</u> Baseline cut-off: Minimum peak height = 3.5E7; Peak duration= 0,01 – 1.0 min; Baseline level= 3.1E7; m/z Center Calculation=Mean <u>Isotopic peaks grouper:</u> m/z tolerance=0,001m/z or 4.0 ppm; Retention time tolerance= 0,1 min; Maximum charge= 2; Representative isotope= most intense. <u>Alignment:</u> Join aligner: m/z tolerance=0,001 m/z or 4.0 ppm; Weight for m/z= 75; Retention time tolerance= 0.1 min; Weight for RT= 25

Legenda: min: minutos; *m/z*: relação massa carga; ppm: partes por milhão. Número de íons na lista de picos: 600 íons.

Tabela 3. Parâmetros usados pelo software MzMine no pré-processamento dos dados no modo negativo obtidos pela análise em UHPLC-ESI-MS (Orbitrap).

<i>Raw data methods/</i>	<u>Mass detection:</u>
<i>Peak detection</i>	Scans: Retention Time: 0-40 min; MS level: MS1 Mass Detector: Exact Mass - Noise level= 5.0E6 <u>Chromatogram builder:</u> Scans: Retention Time: 0-40 min; MS level: MS1 Minimum time span (min)= 0,01; Minimum height = 8.0E6; <i>m/z</i> tolerance= 0,001 <i>m/z</i> or 4.0 ppm
<i>Peak list methods</i>	<u>Chromatogram deconvolution:</u> Baseline cut-off: Minimum peak height = 1.5E7; Peak duration= 0,01 – 1.0 min; Baseline level= 1.0E7; <i>m/z</i> Center Calculation=Mean <u>Isotopic peaks grouper:</u> <i>m/z</i> tolerance=0,001 <i>m/z</i> or 4.0 ppm; Retention time tolerance= 0,1 min; Maximum charge= 2; Representative isotope= most intense. <u>Alignment:</u> Join aligner: <i>m/z</i> tolerance=0,001 <i>m/z</i> or 4.0 ppm; Weight for <i>m/z</i> =75; Retention time tolerance= 0.1 min; Weight for RT= 25

Legenda: min: minutos; *m/z*: relação massa carga; ppm: partes por milhão. Número de íons na lista de picos: 943 íons.

3.6 Análise estatística e mineração de dados (Análise de Correlação *in silico*)

A partir dos dados pré-tratados, foram realizadas as análises multivariadas não-supervisionadas através do PCA (*Principal Component Analysis*), cujos parâmetros foram utilizados para o norteamento das análises supervisionadas, conduzidas via PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*), por meio do *software* SIMCA 13.0.3.0© (Umetrics AB, Suécia).

3.7 Análise qualitativa

3.7.1 Desreplcação para identificação dos metabólitos discriminantes

A desreplcação foi realizada para as substâncias apontadas como discriminantes no estudo quimiométrico para as espécies que ocasionaram as piores performances em *C. lacinia*, neste caso, *E. fosbergii* e *V. polyanthes*.

Os metabólitos discriminantes foram determinados através do VIP (*Variable Influence on Projection*), obtido por meio do método supervisionado PLS-DA. Foram priorizados para identificação os 30 picos indicados com os maiores valores de VIP.

Foi realizada revisão bibliográfica para a coleta de informações acerca de metabólitos previamente identificados como presentes nas espécies de Asteraceae selecionadas para este estudo. A partir das informações coletadas e dos bancos de dados disponíveis, a identificação dos metabólitos discriminantes foi realizada considerando a massa acurada referente ao sinal de interesse, com margem de erro de 4ppm. Para o cálculo das fórmulas moleculares foi utilizado o *software* Molecular Weight Calculator (versão 6.50), desenvolvido por Matthew Monroe (<http://www.alchemistmatt.com>). Os bancos de dados utilizados neste trabalho foram: (AsterDB) (<http://www.asterbiochem.org/asterdb>), SciFinder Scholar® (©American Chemical Society), *Dictionary of Natural Products*© (DNP) (©Taylor & Francis Group), PubChem (©National Center for Biotechnology Information) e Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

Adicionalmente, foram avaliados os tempos de retenção e as fragmentações provenientes dos espectros de massas para comparações com a literatura.

Figura 4. Fluxograma resumido do trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio para avaliação da performance de lagartas de *C. lacinia* nas plantas selecionadas

4.1.1 Piores performances de *C. lacinia*

As espécies que induziram as mais altas taxas de mortalidade em *C. lacinia* foram *E. fosbergii* e *V. polyanthes* (Tabela 5), porém, através de distintos comportamentos alimentares (Tabela 4).

O comportamento alimentar das lagartas tratadas com *E. fosbergii* foi de evitação desde a eclosão dos ovos. A baixíssima ou nenhuma ingestão das folhas ocasionou 100% de mortalidade dos insetos ainda no 1º *instar*, impedindo a aferição das massas das larvas.

A mortalidade induzida por *V. polyanthes*, por outro lado, ocorreu entre o 2º e 3º *instares*, o que permitiu a aferição da massa das lagartas. Como observado na figura 7, a massa média das larvas tratadas com folhas de *V. polyanthes* apresentaram um dos valores mais baixos dentre as sete espécies utilizadas nos ensaios de performances.

Figura 5. *E. fosbergii*. (Foto: Tamy Kenner Maro Stringer).

Figura 6. *V. polyanthes* (Fotos: Maria Elvira Poleti e Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto).

4.1.2 Demais performances de *C. lacinia*

Todos os insetos sobreviventes ao tratamento com as demais espécies vegetais atravessaram a pupação e atingiram a fase adulta.

Como observado na Tabela 5, as maiores taxas de sobrevivência de *C. lacinia* ocorreram nos tratamentos com as espécies *T. procumbens* (controle), apresentando o valor de $0,3\% \pm 1,7$; e *T. diversifolia*, com a taxa de $3,0\% \pm 1,7$, porém, como indicado na Figura 7, a massa média das larvas alimentadas com *T. procumbens* foi superior àquela observada para *T. diversifolia*.

O tratamento com as espécies *B. sulphurea*, *C. japonica*, e *P. hysterothorus* proporcionou um crescimento mais lento, através do qual foram observados mais *instares* de desenvolvimento se comparado às duas espécies anteriores (*T. procumbens* e *T. diversifolia*), que apresentaram apenas quatro estágios de desenvolvimento. Para *B. sulphurea* e *P. hysterothorus*, foram observados cinco *instares*, e, para *C. japonica*, seis *instares*. Ademais, para estas três espécies que induziram retardo no desenvolvimento e para *T. diversifolia*, a maior ingestão das folhas passou a ocorrer entre o 3º e 4º *instares*.

Tabela 4. Comportamento alimentar de *C. lacinia* frente às sete espécies vegetais seguido ou não de morte.

Espécies vegetais	Comportamento alimentar		
	Ingestão + sobrevivência	Ingestão + morte	Evitação + morte
<i>B. sulphurea</i>	X		
<i>C. japonica</i>	X		
<i>E. fosbergii</i>			X
<i>P. hysterothorus</i>	X		
<i>T. diversifolia</i>	X		
<i>T. procumbens</i>	X		
<i>V. polyanthes</i>		X	

Tabela 5. Taxas de mortalidade de *C. lacinia* para as sete espécies vegetais e número de estágios de desenvolvimento atingidos até a pupação.

Espécie vegetal	Mortalidade	Números de <i>instares</i>
<i>B. sulphurea</i>	20 % $\pm$ 0,5	V
<i>C. japonica</i>	23,3% $\pm$ 0,7	VI
<i>E. fosbergii</i>	100%	I
<i>P. hysterothorus</i>	23,3% $\pm$ 0,3	V
<i>T. diversifolia</i>	3,0% $\pm$ 1,7	IV
<i>T. procumbens</i>	0,3% $\pm$ 1,7	IV
<i>V. polyanthes</i>	100%	II

Figura 7. Crescimento de *C. lacinia* mensurado a partir do 2º instar ao longo do processo de metamorfose. À esquerda, são representadas as espécies vegetais e, à direita, seus respectivos *instares*: *V. polyanthes* (Vp – II); *C. japonica* (Cj – II, Cj – III, Cj – IV, Cj – V, Cj – VI); *P. hysterothorus* (Ph – II, Ph – III, Ph – IV, Ph – V); *B. sulphurea* (Bs – II, Bs – III, - Bs – IV, - Bs – V); *T. diversifolia* (Td – II, Td – III, Td IV); *T. procumbens* (Tp – II, Tp – III, Tp – IV). As barras de erro indicam uma variação percentual de $\pm 5\%$.

4.2 Avaliação da sobrevivência das lagartas (Teste-T e estimador de Kaplan-Meier)

A análise do teste-T (Tabela 6) mostrou que a mortalidade das lagartas é estatisticamente correlacionada com a ingestão de uma determinada planta. Nesse sentido, as plantas induziram performances distintas desempenhadas pelas lagartas, pois todas as espécies vegetais utilizadas como dieta, com exceção de *T. diversifolia*, apresentaram significância estatística ($P < 0.05$).

Tabela 6. Comparação entre as médias de mortalidade das lagartas entre o grupo controle e grupos experimentais. Teste-T realizado com duas caudas para amostras independentes entre si (alimentação diferenciada). Foram consideradas amostras estatisticamente significativas aquelas com valores de $P < 0.05$ (sublinhadas na tabela).

Comparação entre as médias p-valor	
Controle x <i>T. diversifolia</i>	1
Controle x <i>V. polyanthes</i>	<u>0,001187</u>
Controle x <i>E. fosbergii</i>	<u>0,001187</u>
Controle x <i>B. sulphurea</i>	<u>0,009964</u>
Controle x <i>P. hysterothorus</i>	<u>0,028596</u>
Controle x <i>C. japonica</i>	<u>0,003126</u>

De modo complementar, as estimativas de sobrevivência dos insetos, tendo como única fonte de alimento uma das sete plantas escolhidas neste estudo, foram conduzidas de acordo com o método de Kaplan-Meier, sendo possível destacar que as melhores performances foram observadas na suplementação das lagartas com as plantas *T. procumbens* (Controle), *T. diversifolia*, *P. hysterothorus* e *B. sulphurea* (Figuras 8, 9, 11 e 12, respectivamente), enquanto as piores performances ocorreram a partir do consumo de folhas de *V. polyanthes* e *E. fosbergii* (Figuras 13 e 14, respectivamente). É importante notar que no cenário experimental em que houve a ingestão de *C. japonica* (Figura 10), a performance foi média, pois assume 50% de probabilidade de sobrevivência por volta do 20º dia de

tratamento, enquanto todas as outras espécies não ativas sequer atingem esta porcentagem durante todo o período de tratamento. As espécies vegetais ativas *V. polyanthes* e *E. fosbergii*, por outro lado, demonstram 50% de probabilidade de sobrevivência no 5º e 2º dia de tratamento, respectivamente (Figuras 13 e 14).

Avaliando os p-valores obtidos a partir do teste-T e do estimador de Kaplan-Meier, somente *V. polyanthes* apresentou p-valores estatisticamente significativos em ambos os métodos de análise, indicando que a alimentação (o efeito do tratamento sobre o animal) estava diretamente relacionada às predições de sobrevivência ao longo dos ensaios. É provável, portanto, que a mortalidade das lagartas para as demais espécies, mesmo que baixa, nos cenários de ótimas e média performances, sejam devido não à alimentação das larvas, mas sim a condições fisiológicas individuais dos organismos.

Embora tenha sido detectada uma diferença estatística entre os grupos controle e experimentais por meio do teste-T, esse dado não permite identificar se a origem da mortalidade observada nos ensaios de sobrevivência ocorreu devido ao consumo, à evitação em relação ao alimento ou ainda em razão de condições fisiológicas específicas das larvas durante suas etapas de metamorfose.

E. fosbergii, assim como *V. polyanthes*, induziu 100% de mortalidade nas lagartas, porém, como mencionado no item 4.1.1, não foi possível mensurar o crescimento em massa das lagartas, pois estas apresentaram um forte comportamento de deterrência observado logo após a eclosão dos ovos (1º instar), corroborando o p-valor não significativo para a mortalidade de *C. lacinia* alimentado com esse planta. Dessa forma, as altas taxas de mortalidade em *E. fosbergii* não se relacionam com a alimentação, como em *V. polyanthes*, a partir da qual foi possível mensurar a massa dos insetos até o 2º instar, mas sim com o efeito de deterrência, ocasionando a morte precoce das lagartas por inanição.

Figura 8. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* alimentada com *T. procumbens* (controle experimental) ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.37.

Figura 9. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* alimentada com *T. diversifolia* ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.37.

Figura 10. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *C. japonica* ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.94.

Figura 11. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *P. hysterophorus* ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.66.

Figura 12. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *B. sulphurea*. ao longo de 22 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.75.

Figura 13. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *V. polyanthes* ao longo de 10 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.031 (valor estatisticamente significativo).

Figura 14. Curva de sobrevivência, obtida pelo estimador Kaplan-Meier, de *C. lacinia* em *E. fosbergii* ao longo de 5 dias de ensaio. Os retângulos, coloridos de acordo com a cor da caixa, representam o intervalo de desvio-padrão da probabilidade de sobrevivência ao longo do tempo estimada em uma dada replicata. Para este método, o valor de “p” foi de 0.4.

4.3 Análises metabolômicas

4.3.1 Pré-tratamento dos dados e obtenção das impressões digitais metabólicas

Como descrito no item 3.5, o pré-tratamento dos dados obtidos a partir das extrações do material vegetal submetido à metodologia analítica UHPLC-ESI-MS (Orbitrap) permitiu a reconstituição dos cromatogramas que caracterizam as impressões digitais metabólicas (*metabolite fingerprint*) das espécies vegetais ativas (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Impressão digital metabólica (*metabolite fingerprint*) da espécie *E. fosbergii* expressa pelo cromatograma no modo positivo de ionização (POS) e no modo negativo de ionização (NEG).

Figura 16. Impressão digital metabólica (*metabolite fingerprint*) da espécie *V. polyanthes* expressa pelo cromatograma no modo positivo de ionização (POS) e no modo negativo de ionização (NEG).

4.3.2 Análises estatísticas multivariadas não-supervisionadas

Através da análise por PCA realizada para ambos os modos positivo e negativo, foi possível observar a tendência de agrupamento das espécies por similaridade química, sendo que as amostras tenderam a se agrupar separadamente da espécie *V. polyanthes* (Figura 17). O PCA é uma ferramenta que, em resumo, permite essa observação de tendências e/ou também de *outliers*, que são amostras as quais possuem um comportamento distinto aos demais pertencentes ao conjunto (ERIKSSON et al., 2013; FERREIRA, 2015).

Figura 17. PCA score plot *referente* às componentes 1 e 4. Foram obtidos para este método os valores de 0,623 para R^2X e de -0,331 para Q^2 . A contribuição de R^2X [1] foi de 0,233, e, de R^2X [4], 0,138. Elipse: Hotelling's T2 (95%).

4.3.3 Análises estatísticas multivariadas supervisionadas

Os parâmetros da análise por PCA nortearam a condução dos métodos supervisionados. Visando identificar as substâncias discriminantes que separariam *E. fosbergii* e *V. polyanthes* (ativas) das demais espécies (inativas) foram construídos gráficos PLS-DA. Assim, foram produzidas duas análises via PLS-DA segundo as seguintes abordagens:

- Classificando as espécies em grupo ativo separando (*E. fosbergii*) e grupo inativo (demais espécies vegetais excluindo-se *V. polyanthes*) (Figura 18);
- Classificando as espécies em grupo ativo separando (*V. polyanthes*) e grupo inativo (demais espécies com exceção de *E. fosbergii*) (Figura 19).

As duas diferentes abordagens foram utilizadas em decorrência do fato de as espécies ativas pertencerem a tribos distintas da família Asteraceae. Caso fosse produzida uma única análise do tipo PLS-DA que incluísse *E. fosbergii* e *V. polyanthes* em um único grupo ativo em detrimento das demais espécies, que permaneceriam em um grupo considerado inativo, é possível que fossem apontadas como discriminantes substâncias comuns às duas espécies e que não necessariamente possuem potencial atividade biológica contra *C. lacinia*. Sendo assim, o objetivo foi buscar por metabólitos discriminantes em *E. fosbergii* em detrimento das espécies inativas e que não obrigatoriamente estariam presentes em *V. polyanthes* e vice-versa.

Figura 18. PLS-DA score plot utilizando como classes a espécie *E. fosbergii* e as demais, com exceção de *V. polyanthes*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,655; 1; e 0,979. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,178, e, de R^2X [2], 0,249. Elipse: Hotelling's T2 (95%).

Figura 19. PLS-DA *score plot* utilizando como classes a espécie *V. polyanthes* e as demais, com exceção de *E. fosbergii*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,649; 1; e 0,983. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,263, e, de R^2X [2], 0,192. Elipse: Hotelling's T2 (95%).

Figura 20. *Loading plot* dos 100 íons mais importantes para a projeção do modelo referente a *E. fosbergii*. Os valores obtidos para R^2X (cum), R^2Y (cum) e Q^2 (cum) foram, respectivamente de 0,655; 1; e 0,979. A contribuição de R^2X [1] foi de 0,178; e, de R^2X [2], 0,249.

Figura 21. *Loading plot* dos 100 íons mais importantes para a projeção do modelo referente a *V. polyanthes*. Os valores obtidos para R2X (cum), R2Y (cum) e Q2 (cum) foram, respectivamente de 0,649; 1; e 0,983. A contribuição de R2X [1] foi de 0,263; e, de R2X [2], 0,192.

Como mencionado no item 3.7.1, a partir do direcionamento das análises supervisionadas de PLS-DA, foram utilizados os VIPs para discriminar as substâncias possivelmente ativas. Esse sistema se fundamenta na contribuição que cada variável das análises não-supervisionadas tem para a projeção do modelo. As variáveis consideradas significativas são aquelas cujo valor está acima de “1”.

As Figuras 20 e 21 apresentam o *loading plot* dos íons responsáveis pela projeção do modelo para *E. fosbergii* e *V. polyanthes*, respectivamente, enquanto as Figuras 22 e 23 apresentam o *VIP plot* para *E. fosbergii* e *V. polyanthes*, respectivamente. Abaixo, estão apresentadas as Tabelas 7 e 8 referentes a estes *VIP plots*, as quais apresentam os 30 principais íons discriminantes para as duas espécies que direcionaram a identificação dos metabólitos potencialmente ativos.

Figura 22. VIP plot obtido através do método PLS-DA para a espécie *E. fosbergii*.

Figura 23. VIP plot obtido através do método PLS-DA para a espécie *V. polyanthes*.

Tabela 7. 30 íons referentes às substâncias discriminantes apontadas com os maiores valores de VIP para *E. fosbergii*.

ID (Número do Íon)	Valores de m/z	Valores de VIP
NEG 285	133.012	11.0065
NEG 642	283.045	6.51259
NEG 94	191.054	6.02008
NEG 434	447.091	5.60465
NEG 643	285.06	5.50861
POS 491	449.108	5.14961
POS 565	279.16	4.73432
POS 60	355.103	4.45431
NEG 31	707.178	4.25128
POS 552	303.05	4.24264

NEG 644	463.086	4.2345
NEG 647	343.101	4.02578
NEG 649	505.133	4
POS 553	498.162	3.78746
NEG 314	383.117	3.71129
NEG 145	549.086	3.6621
NEG 646	467.153	3.64833
NEG 645	461.107	3.60077
POS 114	621.272	3.59546
NEG 650	341.086	3.44414
POS 599	110.021	3.39371
POS 588	118.087	3.24834
POS 73	163.039	3.17227
NEG 657	479.117	3.09616
NEG 668	525.123	3.01719
POS 554	551.105	3.01719
NEG 648	421.206	2.94782
NEG 294	354.089	2.9349
NEG 651	287.076	2.92433
NEG 450	895.189	2.82288

Tabela 8. 30 íons referentes às substâncias discriminantes apontadas com os maiores valores de VIP para *V. polyanthes*.

ID (Número do Íon)	Valores de m/z	Valores de VIP
NEG 280	366.992	10.8277
POS 386	465.176	8.65931
POS 387	257.165	8.36734
POS 388	405.154	7.64282
POS 389	447.165	7.25347
POS 390	315.086	6.32932
POS 391	482.202	5.44248
NEG 281	353.086	4.9011
POS 393	257.165	4.66363
POS 392	482.202	4.65918
NEG 284	103.002	4.53299
POS 403	185.008	4.51926
NEG 282	313.07	4.47319
POS 394	405.155	4.2888
POS 60	355.103	4.26178
POS 395	447.092	3.59519
POS 397	440.192	3.54879
NEG 31	707.178	3.50969
POS 157	163.039	3.49032
POS 156	355.103	3.45964
POS 396	287.175	3.42403
NEG 188	577.266	3.33668
POS 84	517.135	3.31804
NEG 283	707.178	3.30067
NEG 286	283.06	3.26295

POS 401	445.147	3.23746
POS 398	461.108	3.14002
NEG 180	461.07	3.03985
NEG 288	299.054	3.01895
POS 88	499.124	3.01285

4.4 Análise qualitativa

4.4.1 Identificação das substâncias para as espécies ativas (*E. fosbergii* e *V. polyanthes*)

A identificação das substâncias possivelmente ativas foi realizada priorizando os 30 íons referentes aos maiores valores de VIP apresentados nas Tabelas 7 e 8 e, com a conferência concomitante com a literatura. Quando possível, foram identificadas demais substâncias cujos íons não constam entre os 30 detentores dos valores mais altos de VIP, através da busca por informações presentes nos cromatogramas nos espectros de massas com seus padrões de fragmentação (Apêndices 1 a 33), realizando-se sempre a comparação com dados da literatura.

As tabelas que contêm todos os valores de VIP obtidos no estudo estão presentes nos apêndices 34 e 35.

Na Tabela 9, encontram-se as substâncias identificadas para a espécie ativa *V. polyanthes*, dentre as quais destaca-se a presença de ácidos clorogênicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas; e na Tabela 10, constam os metabólitos identificados para a espécie ativa *E. fosgerbii*, dentre os quais destaca-se a presença de ácidos clorogênicos, flavonoides e um alcaloide pirrolizidínico.

Tabela 9. Metabólitos identificados para *V. polyanthes* por desreplicação.

ID	tR (min)	Nome usual e classe do metabólito	F.M. (Massa Monoiso.)	Modo de Ionização Positivo TIC (<i>m/z</i>)	AIF	Modo de Ionização Negativo TIC (<i>m/z</i>)	AIF
1	4,95	ácido 3- <i>O</i> - cafeoilquínico (ácido clorogênico)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ (354,0937)	[M+H] ⁺ 355,1017 bp; [(M+H) - AQ] ⁺ 163,0392	163,04	[M-H] ⁻ 353,0855 bp; [2M-H] ⁻ 707,1792	707,18; 705,16; 353,09; 191,05 bp
2	5,96	ácido 5- <i>O</i> - cafeoilquínico (ácido clorogênico)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ (354,0938)	[M+H] ⁺ 355,1018 bp; [(M+H) - AQ] ⁺ 163,0391	163,04	[M-H] ⁻ 353,0855 bp; [2M-H] ⁻ 707,1791	353,09; 191,05 bp
3	9,06	luteolina 7- <i>O</i> - glicuronídeo (flavonoide - flavona)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂ (462,0786)	[M+H] ⁺ 463,0878	463,09; 287,06 bp	[M-H] ⁻ 461,0694 bp; [2M-H] ⁻ 923,1479	461,07; 285,04 bp

4	9,71	ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico)	$C_{25}H_{24}O_{12}$ (516,1254)	$[M+H]^+$ 517,1340 bp; $[(M+H) - H_2O]^+$ 499,1226; $[(M+H) - AQCAF]^+$ 163,0388	163,04	$[M-H]^-$ 515,1168	515,12; 353,09; 191,05 bp
5	10,11	apigenina 7-O-glicuronídeo (flavonoide – flavona)	$C_{21}H_{18}O_{11}$ (446,0843)	$[M+H]^+$ 447,0923	447,09; 271,06 bp	$[M-H]^-$ 445,0748 bp; $[2M-H]^-$ 891,1585	445,08; 269,04 bp
6	10,67	*chrisoeriol 7-O-glicuronídeo (flavonoide – flavona)	$C_{22}H_{20}O_{12}$ (476,0951)	$[M+H]^+$ 477,1031 bp; $[2M+H]^+$ 953,1992	477,10; 301,07 bp	$[M-H]^-$ 475,0850	951,18; 475,09; 299,05 bp

7	12,89	*isorhamnetina (flavonoide – flavonol)	C₁₆H₁₂O₇ (316,0158)	[M+H]⁺ 317,0660	317,07; 302,04 bp; 285,08; 274,05; 228,04	[M-H]⁻ 315,0490	315,05; 300,03; 271,02 bp; 255,03; 243,03; 227,03
8	13,00	acacetina 7-O-glicuronídeo (flavonoide – flavona)	C₂₂H₂₀O₁₁ (460,0983)	[M+H]⁺ 461,1071 bp; [2M+H]⁺ 921,2100	461,11; 285,08 bp	[M-H]⁻ 459,0895 bp; [2M-H]⁻ 919,1898	919,19; 459,09; 283,06 bp
9	14,19	chrisoeriol (flavonoide – flavona)	C₁₆H₁₂O₆ (300,0622)	[M+H]⁺ 301,0702	301,07; 286,05 bp; 258,05	[M-H]⁻ 299,0542	299,05; 284,03 bp; 256,04; 151,00

10	15,98	piptocarphina A (lactona sesquiterpênica)	$C_{21}H_{26}O_9$ (422,1587)	[M+H] ⁺ 423,1667; [M+NH ₄] ⁺ 440,1931; [M+Na] ⁺ 445, 1464 bp; [(M+H) - C ₂ H ₂ O - 2H ₂ O] 345,1335; [(M+H) - C ₄ H ₄ O - 2H ₂ O] ⁺ 319,1181	445,15; 405,16; 345,13; 319,12; 301,07; 259,10; 213,09 bp; 173,06	-	-
11	17,25	*provável hirsutinolido	$C_{21}H_{26}O_8$ (406,1616)	[M+H] ⁺ 407,1696 bp; [M+NH ₄] ⁺ 424,1967	424,20; 244,15 bp	-	-
12	17,70	*genkwanina (flavonoide – flavona)	$C_{16}H_{12}O_5$ (284,0683)	[M+H] ⁺ 285,0755	285,08; 270,05; 242,06 bp	[M-H] ⁻ 283,0601	283,06; 268,04 bp

13	18,12	3',4'-dimetoxiluteolina (flavonoide – flavona)	$C_{17}H_{14}O_6$ (314,0784)	[M+H] ⁺ 315,0864	315,09; 300,06 bp; 272,07	[M-H] ⁻ 313,0693	313,07; 298,05; 283,02; 255,03 bp
14	18,64	glaucolido A (lactona sesquiterpênica – glaucolido)	$C_{23}H_{28}O_{10}$ (464,1668)	[M+H] ⁺ 465,1748 bp; [(M + H) - H ₂ O] ⁺ 482,2023; [M+NH ₄] ⁺ 482,202; [M+Na] ⁺ 487,1589	487,16; 465,18; 405,15; 259,10; 189,05 bp	-	-
15	19,51	*8-tigloilóxi-glaucolido A (lactona sesquiterpênica – glaucolido)	$C_{24}H_{30}O_{10}$ (478,1829)	[M+H] ⁺ 479,1909 bp; [M+NH ₄] ⁺ 496,2191; [M+Na] ⁺ 501,1731; [(M+H) - C ₅ H ₆ O] ⁺ 397,1502; [(M+H) - C ₅ H ₆ O - H ₂ O] ⁺ 379,1385	501,17 bp; 379,14	-	-

*metabólitos desreplicados que não constam entre os 30 maiores valores de VIP.

Legenda: ID: identificação do pico; tR: tempo de retenção (minutos); F.M.: fórmula molecular; Massa monoiso.: massa monoisotópica; TIC: *Total Ion Chromatogram*; AIF: *All Ion Fragmentation*; bp: *base peak* (pico base); AQ: ácido quínico; CAF: unidade cafeoil.

Tabela 10. Metabólitos identificados para *E. fosbergii* por desreplicação.

ID	tR (min)	Nome usual e classe do metabólito	F.M. (Massa Monoisot.)	Modo de Ionização Positivo TIC (<i>m/z</i>)	AIF	Modo de Ionização Negativo TIC (<i>m/z</i>)	AIF
16	3,72	provável N-óxido		[M+H] ⁺ 118,0868 (C ₈ H ₈ N ⁺)	-	-	-
2	5,96	ácido 5-O- cafeoilquínico (ácido clorogênico)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ (354,0937)	[M+H] ⁺ 355,1017 bp; [(M+H) - AQ] ⁺ 163,0392	163,039	[M-H] ⁻ 353,0855 bp; [2M-H] ⁻ 707,1792	707,18; 705,16; 353,09; 191,05 bp
17	8,76	senquirquina (alcaloide pirrolizidínico)	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆ (365,1821)	[M+H] ⁺ (366,1901)	366,19; 149,02 bp; 121,03; 107,05	-	-
18	9,43	quercetina-3-O-malonil- hexosídeo	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅ (550,0967)	[M+H] ⁺ 551,1047	551,10; 303,05 bp	[M-H] ⁻ 549,0860	549,09; 505,10; 300,03 bp

19	9,84	quercetina-3-O-rhamnosídeo	$C_{21}H_{20}O_{11}$ (448,1002)	$[M+H]^+$ 449,1082	471,09; 449,11; 303,05 bp	$[M-H]^-$ 447,0907	447,09; 300,03 bp
----	------	----------------------------	------------------------------------	--------------------	---------------------------------	-----------------------	----------------------

Legenda: ID: identificação do pico; tR: tempo de retenção (minutos); F.M.: fórmula molecular; Massa monoiso.: massa monoisotópica; TIC: *Total Ion Chromatogram*; AIF: *All Ion Fragmentation*; bp: *base peak* (pico base); AQ: ácido quínico.

4.4.1.1 Ácidos clorogênicos

Os tempos de retenção dos picos cromatográficos dos ácidos 3-O-cafeoilquínico (Pico 1) e 5-O-cafeoilquínico (Pico 2) foram de 4,3 e 5,96 minutos, respectivamente.

O padrão de fragmentação no modo negativo do espectro de MS-AIF permitiu a diferenciação entre as substâncias, tendo em vista que a molécula protonada apresentou o valor de m/z 355,103 $[M+H]^+$ e de m/z 353,086 $[M-H]^-$ para a molécula desprotonada, para ambas as substâncias. Adicionalmente, os tempos de retenção contribuíram para a identificação segundo relatos na literatura através da utilização de mesmo método analítico (BELAY; GHOLAP, 2009; SAKAKIBARA et al., 2003). (CLIFFORD et al., 2003; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; LIN; HARNLY, 2007; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

O pico 4, cujo tempo de retenção foi de 9,71 minutos, pertence ao ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, para o qual se observou a molécula protonada m/z 517,135 $[M+H]^+$, e a molécula desprotonada m/z 315,1168 $[M-H]^-$ (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2008; LIN; HARNLY, 2007; SAKAKIBARA et al., 2003; GALLON et al., 2018).

Figura 24. Representação estrutural dos ácidos clorogênicos identificados nas amostras de espécies ativas.

4.4.1.2 Flavonoides

O flavonoide do tipo flavonol isorhamnetina, identificada como pico 7 ($t_R = 12,89$ min), apresentou íons precursores referentes às moléculas protonada e desprotonada m/z 317,0660 $[M + H]^+$ e m/z 315,0490 $[M - H]^-$, respectivamente, e os padrões de fragmentação característicos (MARTUCCI et al., 2014).

Os demais flavonoides identificados são do tipo flavona.

O pico 3 se refere à substância luteolina 7-O-glicuronídeo, a qual apresentou t_R de 9,06 minutos e moléculas protonada e desprotonada m/z 463,0878 $[M+H]^+$ e m/z 461,0694 $[M-H]^-$ respectivamente, sendo os demais fragmentos confirmados pelas comparações com a literatura (SAKAKIBARA et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

Em seguida, o pico 5, identificado no t_R de 10,11 minutos como apigenina 7-O-glicuronídeo, demonstrou a molécula protonada m/z 447,0923 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 445,0748 $[M-H]^-$, além dos íons fragmentos que respaldaram a identificação deste metabólito (SAKAKIBARA et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

A substância chrisoeriol 7-O-glicuronídeo, representada pelo pico 6 e t_R de 10,67 minutos, indicou a molécula protonada m/z 477,1031 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 475,0850 $[M-H]^-$, além de fragmentações características igualmente identificadas na literatura, como a perda da unidade glicuronil, produzindo os íons m/z 299 no modo negativo, e m/z 301 no modo positivo, representantes da aglicona chrisoeriol, íons estes que também estão presentes no metabólito chrisoeriol, indicado pelo pico 9 ($t_R = 14,19$ min), nos valores m/z 301,0702 $[M+H]^+$ para a molécula protonada, e m/z 299,0542 $[M-H]^-$ para a molécula desprotonada (SAKAKIBARA et al., 2003; PLAZONÍĆ et al., 2009; BRITO et al., 2014; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

Na sequência, o pico 8, cujo tempo de retenção observado foi de 13,00 minutos, refere-se à acacetina-7-O-glicuronídeo. Para este metabólito, foram obtidas as moléculas protonada e desprotonada m/z 461,1071 $[M+H]^+$ e m/z

459,0895 $[M-H]^-$, respectivamente, além dos íons relativos à aglicona (acacetina) formados pela perda do grupo glicuronil: m/z 285 no modo positivo, e m/z 283 no modo negativo (SHI et al., 2011; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

O pico de número 12 e tempo de retenção de 17,70 minutos representa a genkwanina, cuja molécula protonada foi notada para m/z 285,0755 $[M+H]^+$, e, a molécula desprotonada, para m/z 283,0601 $[M-H]^-$, além dos íons fragmentos característicos (SAKAKIBARA et al., 2003; WEI et al., 2016; GALLON et al., 2018).

O pico de número 13 (t_R = 18,12 min) foi atribuído à substância 3',4'-dimetoxiluteolina, a qual demonstrou a molécula protonada m/z 315,0864 $[M+H]^+$ e a molécula desprotonada m/z 313,0693 $[M-H]^-$, além dos padrões de fragmentação já descritos na literatura (MARKHAM, 1982; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

O pico 18, indicado no tempo de retenção de 9,43 minutos, refere-se à quercetina-O-malonil-hexosídeo, e demonstrou a molécula protonada $[M+H]^+$ 551,1047 e a molécula a desprotonada $[M-H]^-$ 549,0860 (MARTUCCI et al., 2014).

Por fim, o pico 19 é referente à quercetina-3-O-rhamnosídeo, percebido no tempo de retenção de 9,84 minutos e cujas moléculas protonada e desprotonada são $[M+H]^+$ 449,1082 e $[M-H]^-$ 447,0907, respectivamente (SANTOS et al., 2018).

Figura 25. Representação estrutural dos flavonoides identificados nas amostras de espécies ativas.

4.4.1.3 Lactonas sesquiterpênicas

As lactonas sesquiterpênicas foram identificadas a partir das informações fornecidas pelos espectros de massa no modo positivo.

A piptocarphina A, correspondente ao pico 10, com tR de 15,98 minutos, apresentou a molécula protonada m/z 423,1667 $[M+H]^+$, a molécula sodiada m/z 445,1464 $[M+Na]^+$ e demais fragmentos que permitiram a caracterização da substância (GIRARDI et al., 2016; MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

Um provável hirsutinolido foi indicado pelo pico 11, de tempo de retenção 17,25 minutos, apresentou a molécula protonada m/z 407,1696 $[M+H]^+$, e a molécula m/z $[M+NH_4]^+$ 424,1967, além de íons fragmentados relatados na literatura, culminando em sua caracterização (GALLON et al., 2018).

O glaucolido A, uma LST do tipo glaucolido, referido pelo pico 14, apresentou tR de 18,64 minutos, junto da molécula protonada m/z 465,1748 $[M+H]^+$ e da molécula sodiada m/z 487,15890 $[M+Na]^+$, além dos íons fragmento característicos observados (MARTUCCI et al., 2014; GALLON et al., 2018).

Por fim, o pico 15 se refere à substância 8-tigloiloxiglaucolido A, outra LST do tipo glaucolido, e apresentou tR de 19,51 minutos, junto da molécula protonada m/z 479,1909 $[M+H]^+$, da molécula sodiada m/z 501,1731 $[M+Na]^+$, e também dos íons fragmentos característicos m/z 397, em decorrência da perda da unidade tiglato, e m/z 379, relativo à perda de uma molécula água a partir do íon anterior (GALLON et al., 2018).

Figura 26. Estruturas químicas das lactonas sesquiterpênicas identificadas nas amostras da espécie ativa *V. polyanthes*.

4.4.1.4 Alcaloides pirrolizidínicos e *N*-óxido

O pico 16 ($t_R = 3,72$ min) possivelmente se refere a um fragmento de um alcaloide do tipo *N*-óxido (Figura 27). Os alcaloides de ocorrência natural podem se apresentar na forma de *N*-óxido, de diesteres de otonecina, como alcaloides de anéis abertos mono ou diesterificados, ou na forma de alcaloides de ácidos dicarboxílicos de anel fechado (AVULA et al., 2015). De acordo com MROCZEK (2002; 2004) e AVULA (2015), foram identificados no gênero *Emilia* s.l. e na tribo Senecioneae os alcaloides do tipo *N*-óxido senecionina *N*-óxido, retrosina *N*-óxido e platiphillina *N*-óxido, podendo o fragmento referente ao pico 16 ser proveniente de uma destas substâncias.

Figura 27. Possível fragmento referente ao pico 16.

O pico 17 ($t_R = 8,76$ min) apresentou molécula protonada m/z 366,1901 $[M+H]^+$ e, de acordo com as fragmentações apresentadas (Apêndice 29), foi identificado como senquirquina, um alcaloide pirrolizidínico já descrito na literatura no gênero *Emilia* s.l. e na tribo Senecioneae (AVULA et al., 2015; MROCZEK et al., 2004; JIANG et al., 2009; BOLECHOVÁ et al., 2015).

Os principais fragmentos observados que culminaram na identificação da senquirquina estão indicados na figura abaixo (Figura 28).

Figura 28. Fragmentos do alcaloide senquirquina segundo o espectro de massas obtido.

A identificação dos alcaloides pode ter sido dificultada em decorrência de uma extração incompleta/não eficiente através da metodologia analítica empregada. O pico 17, referente à substância senquirquina, foi encontrado em baixa intensidade, através da busca por alcaloides diretamente nos cromatogramas. As inferências que culminaram na identificação dos picos 16 e 17 foram baseadas nas descrições presentes na literatura acerca das fragmentações e de sua presença no gênero *Emilia* s.l. e na tribo Senecioneae.

Figura 29. Alcaloide pirrolizidínico identificado nas amostras de espécies ativas.

4.5 Contribuição dos valores de VIP na identificação dos metabólitos

As lactonas sesquiterpênicas piptocarphina A (**POS 388** VIP = 7,64) e glaucolido A (**POS 386** VIP = 8,70), junto do flavonoide 3',4'-dimetoxiluteolina (**POS 390** VIP = 6,33 e **NEG 282** VIP = 4,47) apresentaram os maiores valores de VIP (Tabela 11), caracterizando substâncias discriminantes para a espécie *V. polyanthes* e que potencialmente podem estar relacionadas às taxas de mortalidades observadas nos ensaios de performance alimentar das lagartas.

Para *E. fosbergii*, o flavonoide quercetina-3-O-rhamnosídeo foi a substância listada na Tabela 12 com maiores valores de VIP (**POS 491** VIP = 5,15 e **NEG 434** VIP = 5,60), possivelmente contribuindo também para as características deterrentes apresentadas pela espécie vegetal.

Dentre todas as substâncias identificadas, aquelas que não constam na lista dos 30 detentores dos maiores valores de VIP ainda apresentaram valores acima de “1”, com exceção da senquirquina, cujo valor não está presente entre os *loadings* obtidos. Estão entre essas substâncias os flavonoides chrisoeriol 7-O-glicuronídeo, isorhamnetina, acacetina 7-O-glicuronídeo; as LSTs 8-tigloilóxicglaucolido A e o provável hirsutinolido.

Os metabólitos desreplicados para *V. polyanthes* e *E. fosbergii* e seus respectivos valores de VIP se encontram nas tabelas abaixo (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Metabólitos identificados para a espécie *V. polyanthes* e seus respectivos valores de VIP nos modos positivo e negativo.

ID (pico)	Metabólito	ID (discriminante)
1	ácido 3-O-cafeoilquínico	<u>NEG 281</u> (VIP = 4,90) <i>m/z</i> 353,0855 <i>tR</i> = 4,93
		<u>POS 60</u> (VIP = 3,46) <i>m/z</i> 355,1017 <i>tR</i> = 4,93
2	ácido 5-O-cafeoilquínico	<u>POS 156</u> (VIP = 4,26) <i>m/z</i> 355,1018 <i>tR</i> = 5,96
		<u>NEG 31</u> (VIP = 3,51) <i>m/z</i> 707,1791 (dímero) <i>tR</i> = 5,96
3	luteolina 7-O-glicuronídeo	<u>POS 82</u> (VIP = 3,00) <i>m/z</i> 463,0878 <i>tR</i> = 9,06
		<u>NEG 180</u> (VIP = 3,04) <i>m/z</i> 461,0694 <i>tR</i> = 9,06

4	ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	<u>POS 84</u> (VIP = 3,32) <i>m/z</i> 517,1340 tR= 9,71
		NEG 28 (VIP = 1,13) <i>m/z</i> 515,1168 tR= 9,71
5	apigenina 7-O-glicuronídeo	<u>POS 395</u> (VIP = 3,60) <i>m/z</i> 447,0923 tR= 10,11
		NEG 201 (VIP = 2,94) <i>m/z</i> 445,075 tR= 10,11
6	*chrisoeriol 7-O-glicuronídeo	POS 425 (VIP = 1,70) <i>m/z</i> 477,1031 tR= 10,67
		NEG 306 (VIP = 2,18) <i>m/z</i> 475,0850 tR= 10,67

7	*isorhamnetina	POS 431 (VIP = 1,13) <i>m/z</i> 317,0660 tR= 12,89
		NEG 293 (VIP = 1,20) <i>m/z</i> 315,0490 tR= 12,89
8	*acacetina 7-O-glicuronídeo	<u>POS 398</u> (VIP = 3,14) <i>m/z</i> 461,1017 tR= 13,00
		NEG 292 (VIP = 2,57) <i>m/z</i> 459,0895 tR= 13,00
9	chrisoeriol	POS 413 (VIP = 1,80) <i>m/z</i> 301,0702 tR= 14,19
		<u>NEG 288</u> (VIP = 3,02) <i>m/z</i> 299,0542 tR= 14,19
10	piptocarphina A	<u>POS 388</u> (VIP = 7,64) <i>m/z</i> 405,1590 (fragmento) tR= 15,98
11	*provável hirsutinolido	POS 416 (VIP = 1,57) <i>m/z</i> 407,1696 tR= 17,25

12	genkwanina	POS 402 (VIP = 2,54) <i>m/z</i> 285,0755 tR= 17,70
		<u>NEG 286</u> (VIP = 3,27) <i>m/z</i> 283,0601 tR= 17,70
13	3',4'-dimetoxiluteolina	<u>POS 390</u> (VIP = 6,33) <i>m/z</i> 315,0864 tR= 18,12
		<u>NEG 282</u> (VIP = 4,47) <i>m/z</i> 313,0693 tR= 18,12
14	glaucolido A	POS 386 (VIP = 8,70) <i>m/z</i> 465,1748 tR= 18,64
15	*8-tigloilóxiglaucolido A	POS 422 (VIP = 2,01) <i>m/z</i> 479,1909 tR= 19,51

Legenda: os íons referentes aos 30 maiores valores de VIP estão apontados pelo ID "sublinhado".

*substâncias identificadas cujos fragmentos não foram apontados entre a lista dos 30 detentores de mais altos valores de VIP.

Tabela 12. Metabólitos identificados para a espécie *E. fosbergii* e seus respectivos valores de VIP nos modos positivo e negativo.

ID (pico)	Metabólito	ID (discriminante)
16	provável N-óxido	<u>POS 588</u> (VIP = 3,25) <i>m/z</i> 118,0868 tR= 3,25
2	ácido 5-O-cafeoilquínico	<u>POS 60</u> (VIP = 4,45) <i>m/z</i> 355,1018 tR= 5,96
		<u>NEG 31</u> (VIP = 4,25) <i>m/z</i> 707,1791 (dímero) tR= 5,96
17	*senquirquina	-
18	quercetina-3-O-malonil-hexosídeo	<u>POS 554</u> (VIP = 3,02) <i>m/z</i> 551,1047 tR= 9,43
		<u>NEG 145</u> (VIP = 3,66) <i>m/z</i> 549,0806 tR= 9,43

19	quercetina-3-O-rhamnosídeo	<u>POS 491</u> (VIP = 5,15) <i>m/z</i> 449,1082 <i>tR</i> = 9,84
		<u>NEG 434</u> (VIP = 5,60) <i>m/z</i> 447,0907 <i>tR</i> = 9,84

Legenda: os íons referentes aos 30 maiores valores de VIP estão apontados pelo ID “sublinhado”.

*substâncias identificadas cujos fragmentos não foram apontados entre a lista dos 30 detentores de mais altos valores de VIP.

4.6 Metabólitos identificados potencialmente ativos e sua relação com os ensaios de performance

4.6.1 Metabólitos das espécies ativas (*E. fosbergii* e *V. polyanthes*)

A classe de substâncias mais encontradas neste estudo foi a dos flavonoides, dentre os quais alguns são relatados como detentores de ação deterrente contra determinados insetos, o que é devido à adstringência proveniente da precipitação proteica provocada pelos polifenóis. É possível a ocorrência de atividade dissuasiva alimentar mesmo que haja baixas concentrações dos flavonoides nas folhas de determinadas espécies vegetais (HARBORNE et al., 1993; PEREIRA et al., 2002).

Na literatura são encontrados relatos de flavonoides utilizados como dietas para certos lepidópteros e que foram capazes de interferir em seu desenvolvimento normal, como é o caso de estudos cuja dieta baseada em rutina foi capaz de afetar o comportamento alimentar e o desenvolvimento de lagartas e pupas dos lepidópteros *Anticarsia gemmatilis* e *Spodoptera frugiperda*, o que foi reforçado por trabalhos conduzidos a partir de dietas artificiais para ambos os insetos mencionados, denotando potencial tóxico capaz de provocar danos ao sistema digestivo destes insetos. (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; PIUBELLI et al., 2006; SALVADOR et al., 2010; JADHAV et al., 2012).

Metabólitos como a luteolina-7-O-glicuronídeo, presente na lista de substâncias encontradas nas amostras de *V. polyanthes*, fazem parte do grupo dos flavonoides capazes de atuar como deterrentes, o que, em concordância com QI et al. (2008), foi observado para larvas de *Spodoptera litura*, outro lepidóptero caracterizado como praga de lavouras. Além da luteolina-7-O-glicuronídeo, foram encontradas dentre as substâncias discriminantes desreplicadas outros flavonoides glicuronizados, que, de maneira análoga, também são potenciais deterrentes. Determinados flavonoides possuem a capacidade de ocasionar estresse oxidativo nas lagartas de *C. lacinia*, sobretudo em estágios precoces de desenvolvimento, podendo inclusive afetar componentes enzimáticos mitocondriais, como descrito por Vandock et al., (2012) em estudos com o lepidóptero *Manduca sexta*, caracterizando, portanto um possível fator atrelado aos polifenóis responsável pelas taxas de mortalidade e comportamentos alimentares de evitação (BARBEHENN, 2002; SIMMONDS, 2003; MARTUCCI et al., 2016).

Outra classe de metabólitos identificada foi a das lactonas sesquiterpênicas, encontradas particularmente na espécie ativa *V. polyanthes*. De modo geral, essa classe de substâncias possui propriedades tóxicas associadas à citotoxicidade, sobretudo em decorrência de sua estrutura α,β -insaturada capaz de promover a alquilação seletiva de grupos nucleofílicos que contêm grupamentos sulfridril, além de apresentar potencial alelopático, antimicrobiano e de deterrência alimentar (BARUAH et al., 1994; CHEN et al., 2005; FRANKFATER et al. 2005; AMBROSIO, 2008; BUSKUHL et al., 2010; DIMARCO et al., 2012; LIAO et al., 2012; AMORIM et al., 2013; DA COSTA et al., 2016; HICHRI et al., 2017). Estudos anteriores indicam potencial deterrente dessa classe de substâncias não apenas contra lepidópteros, mas também contra coleópteros, como o besouro *Sitophilus granaries* (ADEKENOV, 2015; PACKIAM et al., 2015; PRASIFKA, 2015).

Outra classe encontrada nas análises e que possui relatos de potencial tóxico e deterrente é a dos alcaloides pirrolizidínicos (APs), os quais, conhecidamente, possuem potencial hepatotóxico capaz de afetar humanos e animais, podendo ocasionar inclusive a morte de certas espécies (BREMER, 1994; FU et al., 2001; EDGAR, et al., 2002; HSIEH et al., 2015).

A tribo Senecioneae, a que pertence a espécie bioativa *E. fosbergii*, apresenta em seu arsenal metabólico alcaloides pirrolizidínicos (APs) e alcaloides do tipo N-óxido (MROCZEK et al., 2004). Foram encontrados, inclusive no gênero *Emilia* s.l., APs e alguns do tipo N-óxido, havendo sido isolados por Cheng et al. (1986), a partir da espécie *Emilia sonchifolia*, a senquirquina e a doronina.

Foram encontrados para *E. fosbergii* ácidos clorogênicos, flavonoides de quercetina e um alcaloide pirrolizidínico, representado pela senquirquina, que, apesar de não estar entre as substâncias indicadas como discriminantes, eventualmente em decorrência de adversidades na extração através do método analítico, sua presença junto dos flavonoides é um indicativo de possível ação deterrente e/ou tóxica capaz de provocar o forte comportamento de evitação que culminou na alta porcentagem de mortalidade logo no 1º instar.

4.6.2 Metabólitos das demais espécies vegetais

Ainda que espécies como *B. sulphurea*, *C. japonica*, e *P. hysterophorus* não tenham sido consideradas ativas, foram observados, a partir das dietas com estas espécies, o retardo no desenvolvimento de *C. lacinia*, expresso pelo maior número de instares, e as massas médias reduzidas em relação ao controle *T. procumbens*. Tais fatos podem se relacionar não necessariamente ao valor nutricional das folhas destas espécies vegetais ou à toxicidade de seus metabólitos, mas à baixa ingestão de alimento até instares mais avançados, o que pode ter sido ocasionado por um potencial deterrente das substâncias presentes nas folhas utilizadas como dieta (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006; PIUBELLI et al., 2006; SILVA et al., 2016).

Nas espécies *C. japonica*, *B. sulphurea*, e *P. hysterohperus*, o desenvolvimento das lagartas apresentou mais de 4 estágios, sendo o crescimento mais lento aquele observado em *C. japonica* (6 instares). Tal fato pode estar relacionado à presença de lactonas sesquiterpênicas, visto que a tribo Cichorieae, à qual pertence *C. japonica*, conhecidamente possui grande quantidade de LSTs, sobretudo guaianolidos, havendo indicações na literatura da presença desses metabólitos especificamente nesta espécie

e também nas do gênero *Crepis s.l.*, como crepaside e isolipidiol (ZIDORN, 2008; YAE et al., 2009; KIM et al. 2010; LI et al., 2015; MICHALSKA et al., 2016).

O crescimento lento em *P. hystrophorus* e a baixa ingestão das folhas nos primeiros *instares* também pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos, e de LSTs como a partenina, um de seus metabólitos característicos que garantiram sucesso adaptativo e que possui efeitos hepatotóxicos capazes de afetar humanos (SINGH et al., 2002; VERMA et al., 2006; MULATU et al., 2009; SHABBIR et al., 2012). Reforçando os achados deste estudo, JUSTUS et al. 2003 relatou para *C. lacinia* desenvolvimento desacelerado a partir do tratamento com a espécie *P. hystrophorus*.

A partir do gênero *Bidens s.l.*, foram isoladas substâncias dentre as quais se destacam os flavonoides, incluindo chalconas e auronas, e poliacetilenos (DEBA et al., 2008; LUCHETTI et al., 2009; TOBINAGA et al., 2009; TRIVERDI et al., 2011; WANG, WU e SHI, 2010). Outras classes de metabólitos também foram encontradas neste gênero, como terpenos, esteroides, ácidos carboxílicos, aldeídos, derivados do ácido benzoico, cumarinas, hidrocarbonetos, fenilpropanoides, como os ácidos 3,4- e 4,5-dicafeoil químicos, dentre outras substâncias (BARTOLOME et al., 2013; SILVA et al., 2011). Todo esse arsenal de metabólitos relatado para o gênero *Bidens s.l.* é também indicativo de potencialidades de dissuasão alimentar.

Além dos flavonoides relatados como possíveis substâncias deterrentes, aqueles como a apigenina e a luteolina podem adicionalmente ser considerados fitoestrógenos disruptores de muda e, portanto, a possível presença dessas substâncias na composição química das espécies que provocaram um desenvolvimento tardio nas lagartas pode haver contribuído para o perfil de crescimento observado.

Por outro lado, as melhores performances de *C. lacinia* foram observadas em *T. diversifolia* e em *T. procumbens* (controle), contudo, as massas médias aferidas para *T. diversifolia* foram inferiores àquelas referentes à espécie controle. Embora a face abaxial das folhas de *T. diversifolia* contenha grandes quantidades de tricomas glandulares ricos em LSTs (AMBROSIO et al., 2008), as lagartas nos 3º e 4º *instares*, em

detrimento daquelas de estágios anteriores de desenvolvimento, são capazes de se alimentar de ambas as faces da folha, adaxial e abaxial, sugerindo que haja mecanismos defensivos por parte de *C. lacinia* (AMBROSIO et al., 2008; MARTUCCI et al., 2016).

Além do arsenal químico dos vegetais, há também outros mecanismos de defesa contra a herbivoria, como a produção de barreiras mecânicas em certas plantas, o que inclui o aumento da espessura da folha, a presença de tricomas e de cera epicuticular, ocasionando o comportamento alimentar de desfolhamento de determinadas partes da planta hospedeira em detrimento de outras, o que poderia também explicar o fato de lagartas em estágios de desenvolvimento mais precoces evitarem a face abaxial das folhas de *T. diversifolia* (KOS et al., 2012; POVEDA et al., 2012).

4.7 Possíveis mecanismos de defesa de *C. lacinia*

A respeito da capacidade de *C. lacinia* em lidar com metabólitos deterrentes e/ou tóxicos, é importante ressaltar que este inseto é possivelmente uma espécie aposemática, ou seja, capaz de obter e armazenar, a partir de sua alimentação, substâncias químicas, as quais podem ser utilizadas contra predadores por meio da produção de coloração de alerta e/ou dissuasão alimentar; comunicação intra-específica; e proteção contra micro-organismos e radiação ultravioleta (HARTMANN et al. 1997; NISHIDA, 1995; NISHIDA, 2002; WAHLBERG, 2001). Tal fato pode estar relacionado à capacidade de sobrevivência do inseto ao ser submetido à dieta com as espécies de Asteraceae além daquelas consideradas efetivamente ativas, sobretudo a partir de determinados *instares*, visto que em estágios mais avançados de desenvolvimento, as enzimas do citocromo P-450 tendem a existir em níveis mais elevados, sendo um indicador dessa capacidade de melhor eliminar substâncias tóxicas, o que também justificaria a maior ingestão das folhas de *B. sulphurea*, *C. japonica*, *P. hysterophorus* e inclusive de *T. diversifolia* a partir dos 3º e 4º *instares* (SIMMONDS, 2001; MARTUCCI et al., 2016).

Alguns dos possíveis mecanismos utilizados por *C. lacinia* para lidar com metabólitos potencialmente tóxicos presentes nas espécies estudadas são o controle das concentrações das substâncias, a absorção seletiva, o sequestro, mecanismos de armazenamento, e comportamentos limitantes à quantidade de compostos ingeridos, permitindo a manutenção da viabilidade do inseto (HARBORNE, 2001; WINDE e WITTSTOCK, 2011; IBANEZ et al., 2012; SCHRAMM et al., 2012; MARTUCCI et al., 2016).

No caso dos APs, por exemplo, o perfil de comportamento de distintos insetos frente à presença de um tipo ou outro de alcaloide numa espécie vegetal é bastante diverso (MACEL et al., 2005; NURINGTYAS et al., 2014). Certos insetos são capazes de realizar o sequestro dos APs como mecanismo de defesa (DOBLER 2001; PASTEELS et al., 2003) e o mesmo pode ocorrer para as LSTs (MARTUCCI et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

As espécies *E. fosbergii* e *V. polyanthes* foram consideradas ativas segundo os ensaios de performance de *C. lacinia* ao ser submetida à dieta com sete diferentes membros da família Asteraceae.

As análises estatísticas multivariadas (PCA e PLS-DA) junto das revisões bibliográficas permitiram que fossem identificadas 19 substâncias. A partir de tais informação, percebeu-se que ambas as espécies ativas demonstraram distintas composições químicas, sendo a presença da classe dos flavonoides comum às duas, porém com agliconas e unidades de açúcar diversas. As LSTs (8-tigloilóxi-glaucólido A, glaucólido A, piptocarphina A, e um provável hirsutinólido) foram encontradas em *V. polyanthes* e um AP (senquirquina) e um provável alcaloide do tipo *N*-óxido em *E. fosbergii*. É possível que as diferenças na composição química das espécies vegetais ativas tenham influência sobre os distintos comportamentos alimentares, ocasionando 100% das mortes em diferentes estágios de desenvolvimento (no 1º para *E. fosbergii* e no 2º para *V. polyanthes*).

As altas taxas de mortalidade podem estar associadas tanto à toxicidade dos metabólitos identificados, de modo que *C. lacinia* não seja capaz de se utilizar de mecanismos de defesa para lidar com as substâncias, quanto à deterrência, ocasionando, eventualmente, morte por inanição, como observado em *E. fosbergii*.

As demais espécies vegetais, com exceção de *T. procumbens*, provavelmente apresentam em seu arsenal químico metabólitos indutores de dissuasão alimentar e/ou tóxicos, o que explicaria o retardo no desenvolvimento dos insetos e as massas inferiores àquelas aferidas para o controle positivo durante os ensaios de performance.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEKENOVA A. S.; SAKENOVA P. Y.; IVASENKO, S. A.; KHABAROV I.A.; ADEKENOV, S. M.; BERTHOD, A. Gram-scale purification of two sesquiterpene lactones from *chartolepsis intermedia* boiss. **Chromatographia**, v. 79, p. 37–43, 2015.
- AGIN, A.; HENTZ, D.; RUHLAND, E.; CHAO, J. M.; ZUMSTEG, J.; MOAL, V., et al. Metabolomics: An overview. From basic principles to potential biomarkers. **Médecine Nucléaire**, v. 40, p. 4–10, 2016.
- ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomics analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 33-47, 2010.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1–20, 2015.
- AMBROSIO, S.R., OKI, Y., HELENO, V.C.G., CHAVES, J.S., NASCIMENTO, P.G.B.D., LICHSTON, J.E., CONSTANTINO, M.G., VARANDA, E.M., DA COSTA, F.B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052-2060, 2008.
- AMORIM, M. H. R.; GIL DA COSTA, R. M.; LOPES, C.; BASTOS, M. M. S. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, no. 7, p. 559–579, 2013.
- ANDERBERG, A.A., BALDWIN, B.G., BAYER, R.G., BREITWIESER, J., JEFFREY, C., DILLON, M.O., ELDENÄS, P., FUNK, V., GARCIA-JACAS, N., HIND, D.J.N., KARIS, P.O., LACK, H.W., NESOM, G., NORDENSTAM, B., OBERPRIELER, C. H., PANERO, J. L., PUTTOCK, C., ROBINSON, H., STUESSY, T. F., SUSANNA, A., URTUBEY, E., VOGT, R., WARD, J., WATSON, L.E. Compositae. In: Kubitzki, K., Kadereit, J.W., Jeffrey, C. (Eds.) **Flowering Plants. Eudicots: Asterales**. Berlin: Springer, v. 8, p. 61-588, 2007.
- ASTERDB: banco de dados. Disponível em: <<http://www.asterbiochem.org/asterdb>>. Acesso em: 06 abr. 2017.
- AVULA, B.; SAGI, S.; WANG, Y.H.; ZWEIGENBAUM, J.; WANG, M.; KHAN, I.A. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 178, p. 136–148, 2015.
- BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. Technical problems and practical operations in plant metabolomics. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, p. 300-304, 2006.
- BANERJEE, P. et al. Super Natural II: a database of natural products. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D935–D939, 2015.
- BARBEHENN, R.V. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 1329 e 1347, 2002.

BARTOLOME, A.P.; VILLASEÑOR, I.M.; YANG, W.C. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical properties, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-51, 2013.

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

BELAY, A.; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chem**, v. 3, n. 11, p. 234–240, 2009.

BENTANCOURT, C.M., SCATONI, IB. Lepidópteros de importancia económica. **Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales**. Hemisferio Sur, Montevideo, 1996.

BENTON, H.P., WANT, E.J., EBBELS, T.M.D. Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 19, p. 2488-2489, 2010.

BERG, M., et al. LC-MS METABOLOMICS FROM STUDY DESIGN TO DATA ANALYSIS – USING A VERSATILE PATHOGEN AS A TEST CASE. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Suécia, v. 4, n. 5, p. e201301002, 2013.

BOLECHOVÁ, M.; CÁSLAVSKÝ, J; POSPÍCHALOVÁ, M.; KOSUBOVÁ, P. UPLS-MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed. **Food Chemistry**, v. 1, n. 170, p. 265-270, 2014.

BOLINA, R.C., GARCIA, EF., DUARTE, MG.R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 294-298, 2009.

BREMER, K. Asteraceae. Cladistics and Classification. **Timber Press, Portland**, 1994.

BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400–17421, 2014.

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

CASTRO, H.G., FERREIRA, F.A., SILVA, D.J.H., MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das medicinais: metabólitos secundários**, 2ed.- Visconde do Rio Branco, 113p, 2004.

CHAGAS-PAULA, D.A. **Estudos metabolômicos de Astearaceae por UPLC-UVHRTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através dos métodos in silico**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 97p., 2013.

- CHEN, X.; ZHAN, Z. J.; ZHANG, X. W.; DING, J.; YUE, J. M. Sesquiterpene lactones with potent cytotoxic activities from *Vernonia chinensis*. **Planta Medica**, v. 71, p. 949–954, 2005.
- CHENG, D., & ROEDER, E.C. Pyrrolizidine Alkaloids from *Emilia sonchifolia*. **Planta Medica**, v.6, p. 484-6, 1986.
- CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, 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, n. 10, p. 3821–3832, 2005.
- CONSIDINE, E. C.; THOMAS, G.; BOULESTEIX, A. L.; KHASHAN, A. S.; Kenny, L.C. Critical review of reporting of the data analysis step in metabolomics. **Metabolomics**, v.14, p. 7, 2017.
- CROTTI, A. E. M. et al. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, v. 661, n. 2, p. 99–141, 2006.
- CUNNINGHA, J.P., ZALUCKY, M.P. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? **Journal Economic Entomology**, v. 107, p. 881-896, 2014.
- DA COSTA, F.B., TERFLOTH, L. GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 66, p. 345–353, 2005.
- DA COSTA, F.B., PADILLA-GONZALEZ, G. F. Sesquiterpene Lactones: More than protective plant compounds with high toxicity. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, p. 18–37, 2016.
- DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and anti-oxidant, anti-bacterial and anti-fungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn.var. *radiata*. **Food Control**, v. 19, p. 346-352, 2008.
- DE LA FUENTE, G., et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. **Journal of Proteome Research**. Washington, v.18, n.2, p. 797-802, 2019.
- DIMARCO, R.D., NICE, C.C., FORDYCE, J.A. Family matters: effect of host plant variation in chemical and mechanical defenses on a sequestering specialist herbivore. **Oecologia**, v. 170, p. 687 e 693, 2012.
- DOBLER, S. Evolutionary aspects of defense by recycled plant compounds in herbivorous insects. **Basic Applied Ecology**, v. 2, p.15–26, 2001.
- EDGAR, J. A.; ROEDER, E; MOLYNEUX, R. J. Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 50 (10), p. 2719-2730, 2002.

EMERENCIANO, V.P., RODRIGUES, V.G., ALVARENGA, MACARI, P.A.T., KAPLAN, M.A.C. Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaxonômicos. **Química Nova**, v. 21, p. 125-129, 1998.

ERIKSSON, L. et al. Multi- and Megavariate Data Analysis: Basic principles and applications. 3 ed. Sweden: **MKS Umetrics AB**, 490p., 2013.

FERREIRA, L.S. **Análise da variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria**: conceito, métodos e aplicações. Campinas: Editora da Unicamp, 2015. 493p.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155–171, 2002.

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

FU, P. P et al. Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides — Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. Journal of environmental science and health Part C, **Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Rev**, v. 19, p. 353-385, 2001.

FUNK, V. A. et al. Everywhere but Antarctica : using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, v. 55, p. 343–374, 2005.

FUNK, V.A., SUSANNA, A., STUESSY, T., BAYER, R.J. Classification of Compositae In: FUNK, V. A., SUSANNA, A.; STUESSY, T. F. & BAYER, R. J. (Org) **Systematics, evolution and biogeography of the Compositae**. Vienna: International Association for Plant Taxonomy, 2009, cap. 11, p. 171-189.

GALLON, MARÍLIA ELIAS; MONGE, MARCELO; CASOTI, ROSANA; DA COSTA, FERNANDO BATISTA; SEMIR, JOÃO; GOBBO-NETO, LEONARDO. Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 150, p. 93-105, 2018.

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

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ercoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 254p., 2007.

GIRARDI, C. et al. Analysis and fragmentation mechanisms of hirsutinolide-type sesquiterpene lactones by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, p. 569–580, 2016.

GOBBO-NETO, L., LOPES, NORBERTO, P.L. 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.

GODINHO, CAMILA CAPEL. **Análise metabolômica da bioatividade em vias COX e LOX dependentes de plantas da subtribe Lychnophorinae**. 2016. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-03102016-143050/>>. Acesso em: 2017-04-06.

GORROCHATEGUI, E.; JAUMOT, J.; LACORTE, S.; TAULER, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow. **Trends Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425–42, 2016.

GUIJAS, C., et al. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. **Analytical Chemistry**, Estados Unidos, v. 90, n. 5, p. 3156-3164, 2018.

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

HARTMANN, T., WITTE, L., EHMK, A., THEURING, C., ROWELL-RAHIER, M., and PASTEELS, J. M. Selective sequestration and metabolism of plant derived pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles. **Phytochemistry**, v. 45, p. 489-497, 1997.

HICHRI, F.; ZNATI, M.; BOUJAJILA, J.; BEN JANNET, H. **Journal Asian Natural Products Research**, v. 20, n. 4, p. 344-351, 2017.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RAMOS-NETO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, L. J. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1453-1459, 2006.

HSIEH, C.H.; CHEN, H.W.; LEE, C.C.; HE, B.J.; YANG, Y.C. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Emilia sonchifolia* from Taiwan. **J. Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 1–7, 2015.

IBANEZ, S., GALLET, C., DESPRÉS, L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. **Toxins**, v. 4, p. 228 e 243, 2012.

JADHAV D. R.; MALLIKARJUNA, N.; RATHORE, A.; POKLE, D. Effect of some flavonoids on survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). **Asian Journal of Agric. Sciences**, v. 4, n. 4; p. 298-307, 2012.

JIANG, Z.; LIU, F.; GOH, J. J.; YU, L.; LI, S. F.; ONG, E. S.; ONG, C. N. Determination of senkirkine and senecionine in *Tussilago farfara* using microwave-assisted extraction and pressurized hot water extraction with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 79, p. 539–546, 2009.

JUSTUS, Cláudia M.; PASINI, Amarildo; OLIVEIRA, Émerson D.M. de. Biologia e preferência da lagarta do girassol, *Chlosyne lacinia saundersii* (Lepidoptera: Nymphalidae) na planta daninha losna branca, *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). **Neotropical Entomology**, Londrina , v. 32, n. 1, p. 163-166, Jan. 2003 .

KIM, M.R.; CHA, Y.H.; CHOI, C.W.; CHOI, S.U.; KIM, Y.S.; KIM, Y.H.; RYU, S.Y. Sesquiterpene glycosides from the whole plant extract of *Youngia japonica*. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 41, p. 103-107, 2010.

KOS, M.; HOUSHYANI, B.; WIETSMA, R.; KABOUW, P.; VET, L.E.M.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Effects of glucosinolates on a generalist and a specialist leaf chewing herbivore and an associated parasitoid. **Phytochemistry**. v. 77, p. 162 e 170, 2012.

KUHLISCH, C.; POHNERT, G. Metabolomics in chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 32, p. 937–955, 2015.

LI, Y. Y.; PENG, Z. Q.; HE, S. L.; NI, Y.; HAO, X. L. Chemical constituents from *Crepis crocea*. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v.40, p. 3800-3804, 2015.

LIAO, S.; WANG, Z.; LI, J., LIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, L.; LONG, Q.; WANG, Y. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia bockiana*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.10, p. 230–233, 2012.

LIN, S. M., et al. What is mzXML good for? **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 6, p. 839-845, 2014.

LIN, L.-Z.; HARNLY, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1084–1096, 2007.

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.

LUCHETTI, L.; TEIXEIRA, D.F.; BARBI, N.S.; SILVA, A. J. R. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). **Revista Fitos**, v.4, p.60-70, 2009.

MAAG, D., et al. Metabolomics in plant-herbivore interactions: challenges and applications. **Entomology Experimentalis Applicata**, v. 157, p. 18–29, 2015.

MACEL, M. Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions.” **Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, vol. 10, n. 1, p. 75-82, 2011.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.

MARTUCCI, M.E.P.; DE-VOS, R.C.H.; CAROLLO, C.A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb. **PLOS ONE**, v.9, n.4, e93149, 2014.

- MARTUCCI, M.E., GOBBO-NETO, L. Differential secondary metabolite accumulation and performance of *Chlosyne lacinia* fed with *Tithonia diversifolia* or *Vernonia polyanthes* **Biochemical Systematics Ecology**, v. 68 p. 156-162, 2016
- MICHALSKA, K.; SZNELERB, E.; KISIEL, W. Structure elucidation of an unusual new sesquiterpene lactone glucoside ester from *Crepis pannonica*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54 (2), p. 175–177, 2016.
- MONTENEGRO, L.; CARBONE, C.; MANISCALCO, C.; LAMBUSTA, D.; NICOLOSI, G., et al. In vitro evaluation of quercetin-3-O-acyl esters as topical prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 257262, 2007.
- MOSCARDI, F., BUENO, A.F., SOSA-GÓMEZ, D.R., ROGGIA, S., HOFFMANN-CAMPO, C.B., POMARI, A.F., CORSO, I.C., YANO, S.A.C., 2012. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B., CORRÊA-FERREIRA, B.S., MOSCARDI, F. (Eds.), **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Ártropodes-praga**, Brasília: EMBRAPA, 2012. Cap.4. p. 213-334, 2012
- MORITZ, T., JOHANSSON, A.I. Plant metabolomics. In: Griffiths, W.J. (Ed.) **Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling**. Reino Unido: RSC: Cambridge. 2008.
- MROCZEK, T.; NDJOKO, K.; GLOWNIAK, K.; HOSTETTMANN, K. On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1056, p. 91–977, 2004.
- MULATU, W.; GEZAHEGN, B.; SOLOMON, T. Allelopathic effects of an invasive alien weed *Parthenium hysterophorus* L. compost on lettuce germination and growth. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 1325-1330, 2009.
- NISHIDA, R. Sequestration of plant secondary compounds bt butterflies and moths. **Chemoecology**, v. 5/6, p. 127-138, 1995.
- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 57-92, 2002.
- NURINGTYAS, T. R.; VERPOORTE, R.; KLINKHAMER, P. G. L., et al. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to *Spodoptera exigua* using insect cell lines and injection bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 609-616, 2014.
- PACKIAM, M. S., et al. Feeding Deterrent and Genotoxicity Analysis of a novel Phytopesticide by using Comet Assay against *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 487-493, 2015 .
- PANERO, J. L.; CROZIER, B. S. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 99, p. 116–132, 2016.
- PANIZZI, A.R. FREITAS BUENO, CLOCLET DA SILVA, F.A. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B., CORRÊA-FERREIRA,

B.S., MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de pragas e outros Artrópodes-pragas**. Brasília: EMBRAPA, Cap.5. p.335-420, 2012.

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

PASTEELS, J. M.; THEURING, C.; WINDSOR, D. M.; HARTMANN, T. Uptake and metabolism of [14C] rinderine and [14C]retronecine in leaf-beetles of the genus *Platyphora* and alkaloid accumulation in the exocrine defensive secretions. **Chemoecology**, v. 13, p. 55–62, 2003.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SUZDAK, G. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews*. **Molecular Cell Biology**, 13, 263–269, 2012.

PEREIRA, L. G. B.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F.; MALASPINA, O. (2002). Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* Bent. against *Anticarsia gemmatilis* Hubner and *Spodoptera frugiperda* Smith. **Pest Management Science**, v. 58, n. 5, p. 503-507, 2002.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Baculovirus resistant *Anticarsia gemmatilis* responds differently to dietary rutin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 119, n.1, p. 53-60, 2006.

PLAZONIĆ, A. et al. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, p. 2466–2490, 2009.

POVEDA, K.; JIMENEZ, M.I.G.; HALISCHKE, R.; KESSLER, A. Overcompensating plants: their expression of resistance traits and effects on herbivore preference and performance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 143, p. 245 e 253, 2012.

PRASIFKA J. R.; SPRING O.; CONRAD J.; COOK L. W.; PALMQUIST, D. E.; FOLEY, M. E. Sesquiterpene lactone composition of wild and cultivated sunflowers and biological activity against an insect pest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 4042–4049, 2015.

PULIDO, K.D.P., DULCEY, A.J.C., MARTINEZ, J.H.I.. New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.059>, 2017.

QI, S.H.; ZHANG, S.; QIAN, P.Y.; WANG, B.G. Antifeedant, antibacterial, and antilarval compounds from the South China Sea seagrass *Enhalus acoroides*. **Botanica Marina**, v. 51, p. 441 e 447, 2008.

RIACH, A. C.; FLORANCE, H.; PERERA, M. V. L.; ROBINSON, L. A. Metabolic fingerprints reveal how an insect metabolome is affected by different larval host plant species. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 13, n. 4, p.571-579, 2019.

SAKAKIBARA, H. et al. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 571–581, 2003.

SALVADOR, M. C.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, M. C. N.; GRAÇA, J. P.; SILVA, D. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 774-783, 2010.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 35–42, 2003.

SANTOS, Priscila F. P. et al. Polyphenol and triterpenoid constituents of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves and their antioxidant and cytotoxic potential. **Química Nova**, v. 41, n. 10, p. 1140-1149, 2018.

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

SCHRAMM, K.; VASSÃO, D.G.; REICHEL, M.; GERSHENZON, J., WITTSTOCK, U. Metabolism of glucosinolate-derived isothiocyanates to glutathione conjugates in generalist lepidopteran herbivores. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 174 e 182, 2012.

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 14–21, 2010.

SHABBIR, A.; DHILEEPAN, K.; ADKINS, S. W. Spread of Parthenium weed and its biological control agent in the Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Weed Science Research**, v. 8, p. 581-588, 2012.

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.

SILVA, F.L.; FISCHER, D.C.H.F.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. **Molecules**, v. 16, p. 1070-1102, 2011.

SILVA, Talita Roberta Ferreira Borges et al. Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 38, n. 2, p. 165-170, 2016.

SIMMONDS, M.S.J. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry**, v. 64, p. 21 e 30, 2001.

SIMMONDS, M.S.J. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, v. 56, p. 245 e 252, 2003.

SIMPSON, B. B. Economic importance of Compositae. In: Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Viena: **International Association for Plant Taxonomy**, p. 45–58, 2009.

SMITH, C. A. et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 6, p. 747–751, 2005.

SUD, M., et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 35, n. 1, p. D527-D532, 2007.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

TANK, D. C. et al. Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. **New Phytologist**, v. 207, p. 454–467, 2015.

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.

TOBINAGA, S.; SHARMA, M.K.; AALBERSBERG, W.G.; WATANABE, K.; IGUCHI, K.; NARUI, K.; SASATSU M.; WAKI, S. Isolation and identification of a potent anti-malarial and anti-bacterial polyacetylene from *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v. 75(6), p. 624-628, 2009.

TRIVERDI, P.; KUMAR, J.K.; NEGI, A.S.; SHANKER, K. HPLC method development and validation of cytotoxic agent phenyl-heptatriyne in *Bidens pilosa* with ultrasonic-assisted cloud point extraction and preconcentration. **Biomedical Chromatography**, v. 25, p. 697–706, 2011.

UNDERWOOD, D.L.A. Method for sexing Lepidoptera larvae using external morphology. **Journal of the Lepidopterist's society**, v. 48, p. 258-263, 1994.

VANDOCK, K. P.; MITCHELL, M. J.; FIORAVANTI, C. F. Effects of plant flavonoids on *Manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 80, p. 15-25, 2012.

VAN DEN BERG, R. A., et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, Reino Unido, v. 7, n. 1, p. 142, 2006.

VAN DER KOOY, F., MALTESE, F., CHOI, Y. H., KIM, H. K. & VERPOOTE, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Medica**, v.75, p.763–75, 2009.

VERMA, K. K. Parthenium dermatitis treated with azathioprine weekly pulse doses. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 72, p. 24-27, 2006.

VERPOORTE, R., CHOI, Y.H., KIM, H.K. Metabolomics: will it say? **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 2–3, 2010.

VILLAS-BOAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 385, 2005a.

- VILLAS-BOAS, S.; MAS, S.; AKESSON, J.S.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p.613-646, 2005b.
- WAHLBERG, N. The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepdoptera: Nymphalidae). **Evolution**, v. 55(3), p. 522-537, 2001.
- WANG, Q.-Z.; WU, C.-Y.; CHEN, T.; CHEN, X.; ZHAO, X.-M. Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, p.151-61, 2006.
- WANG, R.; WU, Q.X.; SHI, Y.P. Polyacetylenes and flavonoids from the aerial parts of *Bidens pilosa*. **Planta Medica**. v. 76, p. 893-896, 2010.
- WEI, L. et al. An UPLC–MS/MS method for simultaneous quantitation of two coumarins and two flavonoids in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of *Wikstroemia indica* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 1008, p.139–145, 2016.
- WEI, R., et al. Missing Value Imputation Approach for Mass Spectrometry-based Metabolomics Data. **Scientific Reports**, Reino Unido, v. 8, n. 1, p. 663, 2018.
- WISHART, D. S., et al. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 35, n. 1, p. D521-D526, 2007.
- WISHART, D. S., et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 46, n. 1, p. D608-D617, 2018.
- WOLFENDER, J., MARTI, G., QUEIROZ, E.F. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v.14, p. 1808–1832, 2010.
- YAE, E.; YAHARA, S.; EL-AASR, M., et al. Studies on the constituents of whole plants of *Youngia japonica*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, p. 719–23, 2009.
- YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics : a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17–34, 2016.
- ZIDORN, C. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2270-2296, 2008.

APÊNDICES

Apêndice 1. Cromatograma referente à espécie *E. fosbergii* nos modos de ionização positivo (POS) e negativo (NEG). Estão indicados na figura os ácidos clorogênicos em vermelho, os flavonoides em preto, e os alcaloides em azul.

Apêndice 2. Cromatograma referente à espécie *V. polyanthes* nos modos de ionização positivo (POS) e negativo (NEG). Estão indicados na figura os ácidos clorogênicos em vermelho, os flavonoides em preto, e as lactonas sesquiterpênicas em verde.

Legenda: 1: ácido 3-O-cafeoilquínico; 2: ácido 5-O-cafeoilquínico; 3: luteolina 7-O-glicuronídeo; 4: ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; 5: apigenina 7-O-glicuronídeo; 6: chrisoeriol 7-O-glicuronídeo; 7: isorhamnetina; 8: acacetina 7-O-glicuronídeo; 9: chrisoeriol; 10: piptocarphina A; 11: provável hirsutinolido; 12: genkwanina; 13: 3',4'-dimetoxiluteolina; 14: glaucolido A; 15: 8-tigloilóxiglaucolido A.

Apêndice 3. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 1 (ácido 3-O-cafeoilquínico) no modo de ionização positivo.

Apêndice 4. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 1 (ácido 3-*O*-cafeoilquínico) no modo de ionização negativo.

Apêndice 5. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 2 (ácido 5-*O*-cafeoilquínico) no modo de ionização positivo.

Apêndice 6. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 2 (ácido 5-*O*-cafeoilquínico) no modo de ionização negativo.

Apêndice 7. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 3 (luteolina 7-O-glicuronídeo) no modo de ionização positivo.

Apêndice 8. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 3 (luteolina 7-O-glicuronídeo) no modo de ionização negativo.

Apêndice 9. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 4 (ácido-3,5-O-dicafeoilquínico) no modo de ionização positivo.

Apêndice 10. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 4 (ácido-3,5-O-dicafeoilquínico) no modo de ionização negativo.

Apêndice 11. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 5 (apigenina-7-O-glicuronídeo) no modo de ionização positivo.

Apêndice 12. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 5 (apigenina-7-O-glicuronídeo) no modo de ionização negativo.

Apêndice 13. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 6 (chrisoeriol-7-O-glicuronídeo) no modo de ionização positivo.

Apêndice 14. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 6 (chrisoeriol-7-O-glicuronídeo) no modo de ionização negativo.

Apêndice 15. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 7 (isorhamnetina) no modo de ionização positivo.

Apêndice 16. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 7 (isorhamnetina) no modo de ionização negativo.

Apêndice 17. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 8 (acacetina-7-O-glicuronídeo) no modo de ionização positivo.

Apêndice 18. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 8 (acacetina-7-O-glicuronídeo) no modo de ionização negativo.

Apêndice 19. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 9 (chrisoeriol) no modo de ionização positivo.

Apêndice 20. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 9 (chrisoeriol) no modo de ionização negativo.

Apêndice 21. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 10 (piptocarphina A) no modo de ionização positivo.

Apêndice 22. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 11 (provável hirsutinolido) no modo de ionização positivo.

Apêndice 23. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 12 (genkwanina) no modo de ionização positivo.

Apêndice 24. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 12 (genkwanina) no modo de ionização negativo.

Apêndice 25. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 13 (3',4'-dimetoxiluteolina) no modo de ionização positivo.

Apêndice 26. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 13 (3',4'-dimetoxiluteolina) no modo de ionização negativo.

Apêndice 27. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 14 (glaucólido A) no modo de ionização positivo.

Apêndice 28. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 15 (8-tigloilóxiglaucólido A) no modo de ionização positivo.

Apêndice 29. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 17 (senquirina) no modo de ionização positivo.

Apêndice 30. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 18 (quercetina-3-O-malonil-hexosídeo) no modo de ionização positivo.

Apêndice 31. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 18 (quercetina-3-O-malonil-hexosídeo) no modo de ionização negativo.

Apêndice 32. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 19 (quercetina-3-O-rhamnosídeo) no modo de ionização positivo.

Apêndice 33. Espectros de massas *full MS* (A) e AIF (B) do pico 19 (quercetina-3-O-rhamnosídeo) no modo de ionização negativo.

Apêndice 34. Lista de íons discriminantes e seus respectivos valores de VIP obtidos através da análise PLS-DA para a espécie *E. fosbergii*.

ID (Número do Íon)	Valores de m/z	Tempo de Retenção	Valores de VIP
NEG 285	133.012	1.08939	11.0065
NEG 642	283.045	4.0912	6.51259
NEG 94	191.054	1.02883	6.02008
NEG 434	447.091	9.85089	5.60465
NEG 643	285.06	4.24752	5.50861
POS 491	449.108	9.84132	5.14961
POS 565	279.16	0.608867	4.73432
POS 60	355.103	5.96107	4.45431
NEG 31	707.178	5.97064	4.25128
POS 552	303.05	9.83225	4.24264
NEG 644	463.086	8.77843	4.2345
NEG 647	343.101	3.65813	4.02578
NEG 649	505.133	7.9518	4
POS 553	498.162	5.73907	3.78746
NEG 314	383.117	1.03512	3.71129
NEG 145	549.086	9.46153	3.6621
NEG 646	467.153	11.2199	3.64833
NEG 645	461.107	13.3222	3.60077
POS 114	621.272	28.0879	3.59546
NEG 650	341.086	3.7365	3.44414
POS 599	110.021	13.0729	3.39371
POS 588	118.087	3.72683	3.24834
POS 73	163.039	5.96107	3.17227
NEG 657	479.117	5.74867	3.09616

NEG 668	525.123	5.35683	3.01719
POS 554	551.105	9.43912	3.01719
NEG 648	421.206	12.2852	2.94782
NEG 294	354.089	5.96012	2.9349
NEG 651	287.076	4.56343	2.92433
NEG 450	895.189	9.85089	2.82288
NEG 654	341.086	2.98795	2.81621
POS 593	118.087	3.0175	2.80394
POS 596	144.983	33.6807	2.79161
POS 555	449.109	7.9422	2.75431
NEG 698	559.143	11.6125	2.71649
POS 561	498.162	5.38637	2.70376
POS 564	203.144	19.9495	2.66523
NEG 652	503.118	8.34462	2.61296
POS 186	118.087	7.87856	2.57616
NEG 663	343.102	3.0664	2.5677
POS 563	132.102	1.67027	2.54206
NEG 653	295.044	7.20245	2.52709
POS 364	118.087	1.20638	2.52681
POS 558	481.136	5.77803	2.51478
NEG 704	575.138	10.5892	2.49275
POS 166	263.017	1.05432	2.47036
NEG 690	515.094	5.82665	2.45792
NEG 671	345.117	4.05207	2.38674
POS 578	591.173	11.7604	2.34447
NEG 661	833.211	6.05972	2.3104
NEG 295	533.169	1.05837	2.28886

POS 569	348.13	2.82107	2.28488
NEG 703	447.091	10.4312	2.27581
NEG 373	431.19	7.16322	2.26974
POS 562	348.13	3.21375	2.26213
NEG 660	503.118	7.9518	2.26061
POS 559	486.198	11.2494	2.24376
NEG 701	429.081	10.7861	2.2097
NEG 711	593.149	10.5892	2.19561
POS 556	463.125	13.3125	2.17668
NEG 656	369.081	5.51353	2.14476
POS 82	381.08	1.04143	2.13095
POS 196	496.341	23.3602	2.12518
NEG 178	147.028	1.87488	2.12048
NEG 679	375.092	2.83078	2.10582
NEG 655	489.159	8.85662	2.05611
NEG 658	453.138	10.0366	2.04771
NEG 665	467.154	10.6679	2.02058
NEG 659	461.107	11.0627	2.01888
NEG 669	167.033	4.0912	2.00517
POS 557	447.13	9.90997	1.99136
NEG 666	197.806	1.13088	1.98963
NEG 670	167.033	2.98795	1.96872
NEG 667	169.049	4.24752	1.94404
NEG 38	705.164	5.97064	1.9402
NEG 699	443.096	11.6519	1.92801
NEG 680	591.169	10.1939	1.91365
POS 560	205.159	23.6282	1.90643

NEG 684	429.175	10.2333	1.89555
NEG 674	243.05	3.02717	1.88094
NEG 664	577.154	8.73932	1.84951
NEG 662	305.123	6.49115	1.83829
NEG 158	815.495	36.3785	1.83696
POS 600	118.087	8.80788	1.80993
NEG 683	507.148	8.4628	1.8023
NEG 672	505.096	9.44877	1.74988
NEG 739	590.157	11.7307	1.73801
NEG 682	347.079	11.1415	1.72207
POS 586	118.087	9.43912	1.70597
NEG 100	115.002	1.10091	1.70487
NEG 460	447.091	7.92364	1.69283
NEG 676	453.138	9.21198	1.69176
POS 568	345.119	3.6485	1.67538
POS 580	481.136	5.46475	1.66506
NEG 677	195.809	1.13088	1.64002
POS 567	207.139	7.15358	1.62947
POS 280	249.11	30.8361	1.61506
POS 570	269.066	4.2379	1.58875
NEG 708	365.063	2.83078	1.58658
NEG 99	375.201	12.4951	1.56969
NEG 457	483.067	9.85089	1.56957
NEG 673	461.107	8.14763	1.5691
NEG 747	577.154	11.6519	1.55586
POS 573	507.151	7.9422	1.55142
NEG 692	108.02	3.02717	1.51544

NEG 320	354.089	6.81181	1.51537
POS 594	118.087	8.33492	1.51316
NEG 722	542.113	5.70967	1.48556
NEG 689	375.092	3.22345	1.48324
NEG 693	547.071	9.44877	1.47625
POS 141	163.039	6.81837	1.47261
POS 566	137.06	1.35548	1.45507
NEG 720	675.154	7.9128	1.44318
NEG 694	293.029	7.20245	1.44078
NEG 688	367.065	5.51353	1.42151
NEG 727	776.55	30.455	1.41908
NEG 687	477.102	12.0469	1.40933
NEG 681	373.149	8.62115	1.40197
NEG 702	524.102	13.3222	1.40197
NEG 127	144.922	30.8127	1.39868
NEG 675	363.032	1.0145	1.39704
NEG 691	365.063	3.22345	1.39704
NEG 37	117.017	1.77187	1.3631
NEG 721	149.023	5.74867	1.34421
POS 343	675.268	17.3012	1.34331
NEG 115	619.254	28.087	1.32937
NEG 715	108.02	4.0912	1.32613
POS 571	287.077	4.2379	1.32353
NEG 48	351.07	5.97712	1.3146
NEG 233	439.074	1.18302	1.31393
POS 572	498.162	6.08902	1.31306
NEG 719	542.113	5.43527	1.31044

NEG 697	291.107	4.96012	1.30516
NEG 695	177.018	7.20245	1.29455
NEG 696	275.02	1.20867	1.29455
NEG 685	607.164	8.18698	1.27306
NEG 678	525.122	6.09858	1.26763
NEG 718	199.803	1.13088	1.26218
NEG 724	289.092	3.34147	1.26218
NEG 686	609.143	9.60583	1.24845
POS 574	579.172	8.72968	1.24013
NEG 709	133.013	7.20245	1.23456
POS 575	154.087	1.35548	1.22896
NEG 717	465.138	11.2199	1.22615
NEG 338	707.179	6.81822	1.21626
POS 577	317.066	13.3125	1.20631
NEG 705	479.13	8.85662	1.18613
NEG 713	506.149	8.85662	1.1803
NEG 723	623.159	11.3373	1.1656
POS 264	372.129	6.81522	1.16298
NEG 104	351.071	6.81505	1.16249
NEG 730	549.232	15.3669	1.15669
POS 263	355.103	6.81522	1.15206
POS 579	463.125	8.13795	1.15071
POS 581	593.188	10.027	1.1447
NEG 759	329.087	2.83078	1.14169
NEG 758	707.18	5.51353	1.13866
NEG 700	685.195	3.6973	1.12954
POS 584	149.024	30.7995	1.11417

NEG 707	563.102	12.4828	1.10796
NEG 187	304.99	1.09093	1.10565
POS 590	156.102	1.12133	1.09544
NEG 710	131.07	6.5308	1.08596
NEG 746	268.936	1.16973	1.08596
NEG 716	497.083	13.3222	1.08278
NEG 712	363.18	17.7447	1.07959
NEG 740	329.086	3.22345	1.07318
NEG 745	179.054	1.09207	1.06997
NEG 734	371.097	3.59405	1.0677
NEG 508	309.118	3.29843	1.06151
NEG 750	167.033	5.74867	1.06025
POS 171	199.988	37.9396	1.05399
NEG 741	179.054	3.22345	1.05373
NEG 725	315.107	4.60282	1.03057
NEG 155	325.183	30.7808	1.01103
NEG 101	475.128	1.1145	1.00551
NEG 754	149.023	3.22345	1

Apêndice 35. Lista de íons discriminantes e seus respectivos valores de VIP obtidos através da análise PLS-DA para a espécie *V. polyanthes*.

ID (Número do Íon)	Valores de m/z	Tempo de Retenção	Valores de VIP
NEG 280	366.992	1.78955	10.8277
POS 386	465.176	18.635	8.65931
POS 387	257.165	6.24542	8.36734
POS 388	405.154	15.9775	7.64282
POS 389	447.165	17.9657	7.25347
POS 390	315.086	18.1225	6.32932
POS 391	482.202	17.9657	5.44248
NEG 281	353.086	4.93458	4.9011
POS 393	257.165	7.15333	4.66363
POS 392	482.202	18.635	4.65918
NEG 284	103.002	1.16562	4.53299
POS 403	185.008	1.81892	4.51926
NEG 282	313.07	18.1322	4.47319
POS 394	405.155	18.318	4.2888
POS 60	355.103	5.96107	4.26178
POS 395	447.092	10.1122	3.59519
POS 397	440.192	15.9775	3.54879
NEG 31	707.178	5.97064	3.50969
POS 157	163.039	4.92845	3.49032
POS 156	355.103	4.92845	3.45964
POS 396	287.175	11.8859	3.42403
NEG 188	577.266	22.6189	3.33668
POS 84	517.135	9.70523	3.31804
NEG 283	707.178	4.93974	3.30067

NEG 286	283.06	17.6995	3.26295
POS 401	445.147	15.9775	3.23746
POS 398	461.108	12.9936	3.14002
NEG 180	461.07	9.06385	3.03985
NEG 288	299.054	15.9482	3.01895
POS 88	499.124	9.71495	3.01285
NEG 82	225.06	0.93999	3.00635
POS 400	463.087	9.09337	3.00018
NEG 201	445.075	10.1291	2.93849
POS 406	487.157	17.9657	2.93546
POS 404	303.155	1.46823	2.73832
POS 411	118.087	1.0395	2.6538
POS 73	163.039	5.96107	2.57284
NEG 292	459.091	13.0032	2.56651
POS 399	293.064	1.0158	2.56578
POS 427	279.159	0.503833	2.55335
POS 402	285.076	17.6898	2.54218
NEG 289	705.163	4.93974	2.4518
POS 466	118.087	10.1512	2.40829
POS 405	946.371	18.635	2.38234
NEG 63	721.362	20.0073	2.38084
NEG 291	299.054	14.1556	2.37363
POS 407	319.118	15.9775	2.35612
POS 424	130.086	1.31208	2.31174
POS 484	110.02	14.3042	2.2847
NEG 297	467.153	16.0259	2.2665
POS 414	487.157	18.635	2.22964

POS 487	158.961	38.2978	2.22033
POS 477	110.02	13.748	2.21098
NEG 318	203.018	1.24362	2.20159
NEG 327	419.903	1.75057	2.20159
POS 409	423.165	15.9775	2.19216
NEG 306	475.086	10.6716	2.18269
NEG 294	354.089	5.96012	2.14845
NEG 87	559.31	21.5138	2.07812
POS 419	465.103	8.89887	2.05563
POS 422	479.192	19.5112	2.0108
POS 412	465.176	17.9657	2.00564
POS 479	110.02	12.3212	1.9984
NEG 293	315.049	12.8857	1.99736
NEG 296	457.125	15.9871	1.99113
POS 469	149.024	3.98575	1.99113
POS 117	455.117	1.01534	1.94612
POS 408	364.233	13.0326	1.92985
NEG 363	282.917	1.86747	1.8941
POS 410	255.149	5.58013	1.87431
NEG 335	368.996	1.78955	1.85989
NEG 298	449.2	9.26117	1.85766
POS 435	285.16	10.5433	1.83748
POS 303	353.269	20.0252	1.82443
NEG 302	517.132	12.4497	1.81137
POS 417	345.133	15.9775	1.80908
NEG 300	547.215	11.4613	1.80449
POS 413	301.071	14.1459	1.80105

POS 436	136.062	1.07828	1.78719
POS 428	121.065	1.66303	1.7779
POS 149	163.039	9.69736	1.76576
NEG 224	195.049	0.986092	1.72834
NEG 301	351.07	4.91906	1.71974
POS 418	257.165	4.90755	1.7102
POS 420	459.163	18.318	1.70899
POS 481	110.02	11.6091	1.70656
POS 425	477.103	10.6618	1.6956
NEG 299	387.112	0.986711	1.67806
POS 423	694.401	19.9903	1.66104
NEG 290	165.039	0.98858	1.63096
POS 486	118.087	1.93595	1.61809
POS 171	199.988	37.9396	1.60597
POS 415	454.207	18.318	1.59228
POS 474	149.023	29.6052	1.58968
NEG 309	923.146	9.0655	1.58053
NEG 308	329.065	15.0731	1.57528
POS 416	407.17	17.2117	1.56605
NEG 368	183.995	1.82848	1.56472
NEG 305	193.049	10.1896	1.56286
POS 430	259.097	15.9775	1.54071
NEG 310	445.117	1.16562	1.53667
POS 485	110.02	11.2153	1.52177
POS 483	149.023	6.01227	1.51085
POS 437	951.326	18.635	1.50673
NEG 383	420.91	1.82848	1.47055

NEG 313	362.216	13.0423	1.46066
POS 441	419.17	17.172	1.45924
POS 426	301.071	15.8997	1.45497
NEG 323	595.286	23.1442	1.45355
NEG 331	517.122	9.67859	1.41696
POS 482	144.982	31.7012	1.40721
NEG 67	191.054	5.97064	1.40027
NEG 317	327.07	5.62945	1.38645
POS 429	532.349	21.5053	1.36081
POS 444	461.121	15.9775	1.35776
POS 449	405.155	17.9657	1.34088
POS 196	496.341	23.3602	1.33664
NEG 181	387.164	6.96344	1.32517
NEG 312	919.189	13.0032	1.32378
POS 440	271.144	4.10592	1.27921
POS 439	397.15	18.635	1.27759
POS 438	483.187	18.635	1.27109
POS 434	353.269	21.5053	1.26619
POS 453	303.155	1.19498	1.25963
NEG 418	311.167	28.0595	1.25304
POS 182	222.061	1.56809	1.23104
POS 476	118.087	9.11292	1.22171
NEG 319	563.174	10.9081	1.22122
NEG 414	140.005	1.78955	1.19204
POS 459	249.11	31.6131	1.18311
NEG 358	459.055	9.10457	1.1763
POS 443	331.081	15.0633	1.1763

NEG 92	179.033	6.25057	1.17477
NEG 324	489.195	7.32172	1.17454
POS 446	226.123	6.24542	1.171
NEG 322	509.163	13.7976	1.16746
NEG 315	891.157	10.1218	1.16568
POS 452	503.131	17.9657	1.16213
NEG 321	459.148	6.45137	1.16034
NEG 125	337.091	7.02601	1.15918
NEG 346	287.003	1.39982	1.15677
POS 151	517.135	10.2582	1.1557
NEG 343	499.122	10.7502	1.15138
NEG 38	705.164	5.97064	1.14843
NEG 375	453.01	5.03362	1.14778
POS 421	236.149	1.17385	1.1475
POS 433	285.16	9.2123	1.13872
POS 431	317.066	12.8761	1.13325
NEG 68	513.101	9.6658	1.13001
NEG 326	484.143	16.0259	1.12775
NEG 328	533.09	10.317	1.12407
POS 432	467.192	19.0722	1.11853
POS 138	559.11	5.96184	1.10967
NEG 303	181.07	0.9715	1.08277
NEG 348	493.096	9.73167	1.07316
NEG 332	531.148	12.2119	1.07123
NEG 240	555.282	25.0371	1.06992
NEG 304	371.117	0.991813	1.06825
NEG 386	665.278	15.2316	1.04777

NEG 329	475.143	5.7482	1.04579
NEG 413	160.84	17.9757	1.04579
NEG 347	531.112	7.92043	1.04261
NEG 336	177.017	6.25505	1.0258
NEG 345	921.132	9.10457	1.01972
NEG 372	160.84	18.6838	1.01361