



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Influência dos compostos químicos voláteis e não voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* Roth. nas interações entre o milho (*Zea mays* L.) e sua principal praga, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith)**

**BRUNA SARTÓRIO DE CASTRO**

**Brasília – DF**

**2022**

BRUNA SARTÓRIO DE CASTRO

Influência dos compostos químicos voláteis e não voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* Roth. nas interações entre o milho (*Zea mays* L.) e sua principal praga, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

**Orientador:** Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia.

**Coorientador:** Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes.

**Brasília – DF**

**2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Si Sartório de Castro, Bruna  
Influência dos compostos químicos voláteis e não voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* Roth. nas interações entre o milho (*Zea mays* L.) e sua principal praga, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) / Bruna Sartório de Castro; orientador Mauro Vicentini Correia; co-orientador Maria Carolina Blassioli Moraes. -- Brasília, 2022.  
167 p.

Dissertação(Mestrado em Química) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. Semioquímicos. 2. Cromatografia gasosa. 3. Cromatografia líquida. 4. Espectrometria de massas. I. Vicentini Correia, Mauro, orient. II. Blassioli Moraes, Maria Carolina, co-orient. III. Título.

Bruna Sartório de Castro

Influência dos compostos químicos voláteis e não voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* Roth. nas interações entre o milho (*Zea mays* L.) e sua principal praga, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

Data da aprovação: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia – Orientador

---

Prof. Dr. Wender Alves da Silva – Membro Interno

---

Dr. Diego Martins Magalhães – Membro Externo



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela saúde.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, pelo apoio institucional e pela oportunidade de me tornar Mestre em Química. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o mestrado. À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao Laboratório de Semioquímicos, pela estrutura e pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. Mauro Vicentini Correia, pela orientação, aprendizado, acompanhamento e paciência durante os últimos anos.

À minha coorientadora, Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes, pela imensa dedicação, por todo apoio, ajuda, disponibilidade e conhecimentos transmitidos desde a iniciação científica.

Aos membros da banca, professor Dr. Wender Alves da Silva e Dr. Diego Martins Magalhães, e às suplentes, Dra. Mirian Fernandes Furtado Michereff e Dra. Michely Ferreira Santos de Aquino, agradeço as contribuições e disponibilidade.

Aos pesquisadores colaboradores Dr. Miguel Borges e Dr. Raúl Alberto Laumann, por toda ajuda e profissionalismo durante a execução dos experimentos.

À Stefany da criação de insetos, pelo fornecimento das pupas e lagartas, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao analista da Embrapa Agroenergia, Jose Antônio de Aquino Ribeiro, pela ajuda na realização das análises.

Aos meus queridos pais, Sônia Márcia Sartório de Castro e Ismael Batista de Castro, por serem minha inspiração, e à minha irmã, Bianca Sartório de Castro. Pelo amor incondicional, por estarem presentes em cada momento da minha vida, sempre incentivando e acreditando no meu sucesso. São as pessoas que mais amo na vida.

Ao meu companheiro Lincon, que esteve presente em todos os momentos durante essa trajetória, sempre me ajudando, aconselhando e acalmando quando precisei.

Aos meus colegas que passaram pelo laboratório, e que de alguma forma estiveram comigo durante essa fase, agradeço por toda ajuda e por tornarem os dias mais leves: Paula, João Victor, Érica, Jennifer, Sayuri, Mirian, Michely, Marla, Marcelly, Giancarlo, Débora, Rosa, Bia, Alice.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho. Obrigada!

## RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das plantas mais cultivadas no mundo, e pode ter a sua produtividade reduzida devido ao ataque da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith), a mais destrutiva praga do milho no Brasil. Estudos de campo mostraram que o uso de crotalária (*Crotalaria spectabilis* Roth.) como cultura de bordadura no cultivo do milho, causou uma diminuição no número de plantas de milho com injúria severa da praga *S. frugiperda*. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil químico dos compostos orgânicos voláteis (COVs) e não voláteis produzidos pela crotalária que poderiam estar envolvidos na interação entre o milho e a mariposa *S. frugiperda*. Para isso, foi conduzida a coleta dos COVs de plantas de crotalária e de milho sadias e com injúria de herbivoria de lagartas de *S. frugiperda*. Os extratos de aeração foram analisados por GC-MS e GC-FID. Foram realizadas análises de GC-EAD para identificar quais COVs das duas plantas submetidas à herbivoria possuíam atividade eletrofisiológica nas antenas de fêmeas e de machos, e os compostos voláteis sintéticos que apresentaram resposta eletrofisiológica foram testados em túnel de vento para avaliar se as mariposas eram capazes de distinguir os COVs emitidos por estas duas plantas. Adicionalmente, foi avaliada a preferência de oviposição das fêmeas de *S. frugiperda* às duas plantas. Para a análise do perfil de compostos não voláteis, foram conduzidas extrações em etanol/água de raízes, folhas e sementes de crotalária e análises de HPLC-UV, UHPLC-HRMS e GC-MS. A análise dos extratos contendo os voláteis permitiu a detecção de 39 compostos para a crotalária e 41 para o milho, e as plantas submetidas à injúria de herbivoria emitiram uma quantidade significativamente maior dos compostos. As análises de GC-EAD revelaram, respectivamente, seis e doze compostos eletrofisiologicamente ativos nos extratos de voláteis de crotalária e de milho com injúria de herbivoria, e os bioensaios comportamentais em túnel de vento mostraram que as mariposas foram capazes de distinguir os COVs emitidos por plantas de crotalária e de milho, e que as fêmeas ovipositaram preferencialmente nas plantas de milho. As análises dos compostos não voláteis de crotalária revelaram uma diversidade de alcaloides pirrolizidínicos, flavonoides aglicona e glicosilados, ácidos fenólicos e carboxílicos, que podem estar envolvidos na defesa direta da planta contra herbívoros.

Palavras-chave: semioquímicos, cromatografia gasosa, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most cultivated plants in the world, and its yield can be reduced due to fall armyworm attack (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith), the most destructive pest of maize in Brazil. Field experiments showed that the use of sunn hemp (*Crotalaria spectabilis* Roth.) as a border crop in maize cultivation, caused a decrease in the number of maize plants with *S. frugiperda* severe injury. Therefore, the aim of this study was to evaluate the chemical profile of volatile organic compounds (VOCs) and non-volatile produced by sunn hemp that may be involved in the interaction between maize and *S. frugiperda* moth. For this, VOCs from undamaged and *S. frugiperda* damaged feeding of sunn hemp and maize were collected. The aeration extracts were analyzed by GC-MS and GC-FID. GC-EAD analyzes were conducted to identify which VOCs of the two herbivory-damaged plants had electrophysiological activity in the female and male antennae, and the synthetic compounds that presented an electrophysiological activity were evaluated in a wind tunnel to verify if the moths were able to distinguish the VOCs emitted by these two plants. In addition, the oviposition preference of *S. frugiperda* females' was also evaluated in both plants. For non-volatile compounds profile analysis, ethanol/water extractions of roots, leaves and seeds of sunn hemp were conducted, and the extracts were submitted to HPLC-UV, UHPLC-HRMS and GC-MS analysis. The VOCs analysis of the extracts detected 39 compounds for sunn hemp and 41 for maize, and damaged plants emitted a significantly higher amount of compounds. The GC-EAD analyzes revealed, respectively, six and twelve electrophysiologically active compounds in sunn hemp and maize damaged VOCs extracts, and the wind tunnel behavioral bioassays showed that the moths were able to distinguish the VOCs emitted by sunn hemp and maize plants, and that females oviposited preferentially on maize plants. Non-volatile compounds analysis of sunn hemp revealed a diversity of pyrrolizidine alkaloids, aglycone and glycosylated flavonoids, phenolic and carboxylic acids, which may be involved in the plant defense against herbivores.

Keywords: semiochemicals, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Fases de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **(a)** massa de ovos; **(b)** lagartas no final do segundo instar; **(c)** pupa; **(d)** adultos (mariposas) (imagens pessoais) .....4
- Figura 2.** Plantas de *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabales: Fabaceae) com aproximadamente **(a)** 45 dias após a germinação e **(b)** 4 meses após a germinação, na fase floral (imagens pessoais).....8
- Figura 3.** Estrutura química da monocrotalina.....9
- Figura 4.** Nódulos radiculares de *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabales: Fabaceae) ricos em nitrogênio (adaptado de Nelson & Cox, 2019 e Prado, 2022) .....10
- Figura 5.** Exemplos de ácidos fenólicos e suas estruturas químicas.....15
- Figura 6.** Estrutura geral básica dos flavonoides.....17
- Figura 7.** Estrutura básica dos subgrupos de flavonoides e seus respectivos exemplos...18
- Figura 8.** **(a)** Estruturas básicas da pirrolizidina, **(b)** do N-óxido e **(c)** dos quatro tipos de alcaloides pirrolizidínicos retronecina, heliotridina, otonecina e platinecina, com seus respectivos exemplos monocrotalina, lasiocarpina, clivorina e platifilina.....20
- Figura 9.** Quando uma planta sofre herbivoria e gera efeitos prejudiciais no herbívoro, é considerada defesa direta, e quando ela emite compostos que atraem inimigos naturais do herbívoro, é considerada defesa indireta da planta (adaptado de Coppola et al., 2018) ....24
- Figura 10.** Gráfico representativo da proporção de semioquímicos na participação no mercado global (fonte: Fortune Business Insights, 2021) .....24
- Figura 11.** Esquema do processo de comunicação química, com a percepção do odor pelos receptores olfativos presentes nas sensilas das antenas dos insetos (esquema adaptado de Elgar et al., 2018).....30
- Figura 12.** Esquema representativo de um sistema GC-EAD, demonstrando a divisão do fluxo da coluna para o detector de ionização de chama e para o detector de eletroantenografia (adaptado de Zarbin et al., 1999) .....32
- Figura 13.** Sistema GC-EAD utilizado nos experimentos de eletroantenografia (imagem pessoal) .....32

## CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Estrutura química de alguns COVs emitidos por plantas.....45
- Figura 2.** Sistema de aeração utilizado para a coleta dos compostos orgânicos voláteis das plantas de **(a)** *Crotalaria spectabilis* e de **(b)** milho (genótipo Sintético Spodoptera), em que 1 representa o tubo de vidro contendo o polímero adsorvente Porapak Q (por onde é feita a saída do ar), e 2 representa o filtro de carvão ativado conectado ao tubo de teflon e entrando na parte inferior da câmara, por onde ocorre a entrada de ar purificado (imagens pessoais).....49
- Figura 3.** Sistema empregado para as análises eletrofisiológicas. **(a)** eletrodo de aço inoxidável; **(b)** extremidades da antena de *Spodoptera frugiperda* posicionadas no eletrodo de aço inoxidável, contendo gel condutor de corrente elétrica (imagens pessoais).....52
- Figura 4.** Gaiolas de madeira utilizadas no bioensaio de oviposição de mariposas de *Spodoptera frugiperda*, sem e com chance de escolha, em *Crotalaria spectabilis* e em milho (genótipo Sintético Spodoptera) (imagem pessoal) .....53
- Figura 5.** **(a)** Sistema de aeração utilizado para a coleta dos compostos orgânicos voláteis impregnados no **(b)** septo de borracha (imagens pessoais) .....54
- Figura 6.** Túnel de vento utilizado nos bioensaios, dividido em três áreas (imagem pessoal) .....56
- Figura 7.** Perfil cromatográfico dos compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis* **(a)** sem injúria de herbivoria (azul) e **(b)** com injúria de herbivoria (vermelho) provocada por *Spodoptera frugiperda*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 1 e X = contaminação.....60
- Figura 8.** Perfil cromatográfico dos compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético Spodoptera) **(a)** sem injúria de herbivoria (azul) e **(b)** com injúria de herbivoria (vermelho) provocada por *Spodoptera frugiperda*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 2 e X = contaminação.....62
- Figura 9.** Quantidade total de compostos orgânicos voláteis emitidos por **(a)** *Crotalaria spectabilis* e **(b)** milho (genótipo Sintético Spodoptera) nos diferentes tratamentos e períodos avaliados. Barras seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, de acordo com GLM seguido de Anova ( $\alpha = 95\%$ ) .....62
- Figura 10.** Análise de componentes principais dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Crotalaria spectabilis*, com e sem injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*, nos períodos de **(a)** 0-24 e **(b)** 24-48 h. Circulado em vermelho está o tratamento controle.....64

**Figura 11.** Análise de componentes principais dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelo milho (genótipo Sintético Spodoptera), com e sem injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*, nos períodos de (a) 0-24 e (b) 24-48 h. Circulado em vermelho está o tratamento controle.....65

**Figura 12.** Respostas das antenas de (a) fêmeas e (b) machos de *Spodoptera frugiperda* ao extrato de compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis* com herbivoria provocada pelas lagartas *S. frugiperda*, em análise por cromatografia gasosa acoplada a um detector de eletroantenografia (GC-EAD). Os três gráficos superiores representam os sinais das respostas das antenas obtidos pelo detector de eletroantenografia, e a resposta inferior corresponde ao cromatograma do extrato, obtido pelo detector de ionização de chama. Os compostos eletrofisiologicamente ativos foram: 1. acetato de (Z)-3-hexenila; 2. (E)- $\beta$ -ocimeno; 3. linalol; 4. nonanal; 5. indol; 6.  $\beta$ -cariofileno.....67

**Figura 13.** Respostas das antenas de (a) fêmeas e (b) machos de *Spodoptera frugiperda* ao extrato de compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético Spodoptera), com herbivoria provocada pelas lagartas *S. frugiperda*, em análise por cromatografia gasosa acoplada a um detector de eletroantenografia (GC-EAD). Os três gráficos superiores representam os sinais das respostas das antenas obtidos pelo detector de eletroantenografia, e a resposta inferior corresponde ao cromatograma do extrato, obtido pelo detector de ionização de chama. Os compostos eletrofisiologicamente ativos foram: 1. (E)-2-hexenal; 2. acetato de (Z)-3-hexenila; 3. (E)- $\beta$ -ocimeno; 4. linalol; 5. nonanal; 6. DMNT; 7. salicilato de metila; 8. decanal; 9. indol; 10. ciclosativeno; 11.  $\beta$ -cariofileno; 12. TMTT.....68

**Figura 14.** Respostas eletroantegráficas (EAG) (média  $\pm$  erro padrão) das antenas de (a) fêmeas e machos virgens e (b) acasalados de *Spodoptera frugiperda*, às soluções sintéticas de padrões puros de concentração 1,0 mg/mL. Compostos: 1. (E)-2-hexenal; 2. acetato de (Z)-3-hexenila; 3. (E)- $\beta$ -ocimeno; 4. linalol; 5. nonanal; 6. DMNT; 7. salicilato de metila; 8. decanal; 9. indol; 10. ciclosativeno; 11.  $\beta$ -cariofileno; 12. TMTT. As respostas eletrofisiológicas foram comparadas em relação ao hexano (controle), usando teste-*t* uni-caudal. Barras seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, de acordo com o teste-*t* ( $\alpha = 95\%$ ) .....69

**Figura 15.** Quantidade total de posturas das fêmeas de *Spodoptera frugiperda* nas plantas de *Crotalaria spectabilis* e milho (genótipo Sintético Spodoptera), ao longo dos sete dias, nos experimentos sem e com chance de escolha (N = 7) .....71

**Figura 16.** Proporção de liberação entre os doze compostos contidos nos septos de borracha, que obtiveram resposta eletrofisiológica na técnica de eletroantenografia, ao longo de 30 dias.....71

**Figura 17.** Proporção de liberação entre os compostos que obtiveram resposta eletrofisiológica na técnica de eletroantenografia, na proporção em que as plantas de (a) *Crotalaria spectabilis* e (b) milho (genótipo Sintético Spodoptera) liberam nos períodos de 0-24 e 24-48 h.....72

**Figura 18.** Respostas de mariposas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaios em túnel de vento para o tratamento do septo contendo os compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), e o controle em relação ao ar, considerando (a) fêmeas virgens, (b) fêmeas acasaladas, (c) machos virgens e (d) machos acasalados.....73

**Figura 19.** Respostas de mariposas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaios em túnel de vento para o tratamento do septo contendo os compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis*, e o controle em relação ao ar, considerando (a) fêmeas virgens, (b) fêmeas acasaladas, (c) machos virgens e (d) machos acasalados.....73

**Figura 20.** Proporção das respostas comportamentais das mariposas em relação ao tratamento com septo contendo os compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), e o controle em relação ao ar, avaliando os seguintes aspectos: repouso (sem resposta), antenas em V, batimento de asas, andar na plataforma, chegar nas áreas 1, 2 ou 3, pousar na fonte de odor ou próximo a ela, para (a) fêmeas e (b) machos.....74

**Figura 21.** Proporção das respostas comportamentais das mariposas em relação ao tratamento com septo contendo os compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis*, e o controle em relação ao ar, avaliando os seguintes aspectos: repouso (sem resposta), antenas em V, batimento de asas, andar na plataforma, chegar nas áreas 1, 2 ou 3, pousar na fonte de odor ou próximo a ela, para (a) fêmeas e (b) machos.....74

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Estrutura química de alguns flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados e alcaloides pirrolizidínicos.....85

**Figura 2.** Perfil cromatográfico obtido na análise de HPLC-UV do extrato de raízes de *Crotalaria spectabilis*, no comprimento de onda 260 nm.....96

**Figura 3.** Perfil cromatográfico obtido na análise de HPLC-UV do extrato de folhas de *Crotalaria spectabilis*, no comprimento de onda 260 nm.....97

**Figura 4.** Perfil cromatográfico obtido na análise de HPLC-UV do extrato de sementes de *Crotalaria spectabilis*, no comprimento de onda 260 nm.....97

**Figura 5.** Perfil cromatográfico de íons totais obtido na análise de UHPLC-HRMS do extrato hidroetanólico de raízes de *Crotalaria spectabilis*, após o uso do algoritmo *Dissect*, analisados nos modos de íon (a) positivo e (b) negativo. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 1.....99

**Figura 6.** Perfil cromatográfico de íons totais obtido na análise de UHPLC-HRMS do extrato hidroetanólico de folhas de *Crotalaria spectabilis*, após o uso do algoritmo *Dissect*, analisados nos modos de íon (a) positivo e (b) negativo. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 2.....99

<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico de íons totais obtido na análise de UHPLC-HRMS do extrato hidroetanólico de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> , após o uso do algoritmo <i>Dissect</i> , analisados nos modos de íon (a) positivo e (b) negativo. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 3.....	100
<b>Figura 8.</b> Curvas de calibração dos padrões de (a) monocrotalina, (b) daidzeína, (c) naringenina e (d) genisteína.....	107
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico obtido na análise por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de raízes de <i>Crotalaria spectabilis</i> . Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 5.....	109
<b>Figura 10.</b> Perfil cromatográfico obtido na análise por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de folhas de <i>Crotalaria spectabilis</i> . Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 5.....	109
<b>Figura 11.</b> Perfil cromatográfico obtido na análise por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> . Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 5.....	110
<b>Figura 12.</b> Quantidade total de compostos dos extratos derivatizados com MSTFA das raízes, folhas e sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> (soma $\pm$ erro padrão, em mg/g), separados pelas classes químicas (a) ácidos carboxílicos, (b) ácidos fenólicos, (c) flavonoides e (d) alcaloides pirrolizidínicos. Barras seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha = 95\%$ ) .....	112
<b>Figura 13.</b> Análise de componentes principais dos compostos não voláteis derivatizados com MSTFA das raízes, folhas e sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> .....	113
<b>Figura 14.</b> Estruturas químicas do hidroxidanaidial e dos benzoxazinoídeos DIMBOA e DIMBOA-Glc.....	120



## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1.</b> Fontes de ionização e analisadores de massa utilizados na espectrometria de massas.....	29
--	----

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Quantidade média dos compostos orgânicos voláteis de <i>Crotalaria spectabilis</i> , emitidos por plantas saudáveis (controle) e plantas submetidas à injúria de herbivoria provocada por <i>Spodoptera frugiperda</i> , coletados nos períodos 0-24 e 24-48 h (média $\pm$ erro padrão, em ng/h).....	58
---	----

<b>Tabela 2.</b> Quantidade média dos compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético <i>Spodoptera</i> ) emitidos por plantas saudáveis (controle) e plantas submetidas à injúria de herbivoria provocada por <i>Spodoptera frugiperda</i> , coletados nos períodos 0-24 e 24-48 h (média $\pm$ erro padrão, em ng/h).....	60
---	----

<b>Tabela 3.</b> Valores da análise estatística das respostas eletrofisiológicas das antenas de fêmeas e de machos, virgens e acasalados de <i>Spodoptera frugiperda</i> , aos compostos sintéticos da planta comparadas em relação ao hexano (controle). A resposta dos compostos foi analisada usando teste- <i>t</i> uni-caudal.....	70
---	----

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Dados cromatográficos e de espectrometria de massas dos compostos identificados na análise do extrato hidroetanólico de raízes de <i>Crotalaria spectabilis</i> , por UHPLC-HRMS/MS, nos modos de íon positivo e negativo. O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado no cromatograma da Figura 5.....	101
--	-----

<b>Tabela 2.</b> Dados cromatográficos e de espectrometria de massas dos compostos identificados na análise do extrato hidroetanólico de folhas de <i>Crotalaria spectabilis</i> , por UHPLC-HRMS/MS, nos modos de íon positivo e negativo. O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado no cromatograma da Figura 6.....	102
--	-----

<b>Tabela 3.</b> Dados cromatográficos e de espectrometria de massas dos compostos identificados na análise do extrato hidroetanólico de sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> , por UHPLC-HRMS/MS, nos modos de íon positivo e negativo. O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado no cromatograma da Figura 7.....	104
--	-----

<b>Tabela 4.</b> Quantidade média dos compostos monocrotalina, daidzeína, naringenina e genisteína produzidos por raízes e sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> (média $\pm$ erro padrão, em mg/g).....	107
--	-----

**Tabela 5.** Quantidade média dos compostos identificados nas análises por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de raízes, folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis* (média  $\pm$  erro padrão, em mg/g). O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado nos cromatogramas das Figuras 9, 10 e 11.....110

## LISTA DE ESQUEMAS

### INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

<b>Esquema 1.</b> Esquema simplificado das rotas do metabolismo secundário e suas relações com o metabolismo primário (adaptado e modificado de Taiz & Zeiger, 2002) .....	12
<b>Esquema 2.</b> A biossíntese dos terpenos ocorre através de duas rotas metabólicas (rota do mevalonato e rota do fosfato de metileritritol), nomeadas a partir do seu respectivo intermediário de reação (esquema adaptado de Dewick, 2009) .....	13
<b>Esquema 3.</b> Rota metabólica das lipoxigenases, em que LOX são enzimas lipoxigenases que oxigenam ácidos graxos insaturados, e E são enzimas específicas que atuam nas reações subsequentes (esquema adaptado de Lin et al., 2019) .....	14
<b>Esquema 4.</b> Rota metabólica do chiquimato mostrando uma parte da biossíntese dos ácidos fenólicos, em que E são enzimas específicas que atuam nas reações (adaptado de Dewick, 2009 e Rosa et al., 2019).....	16
<b>Esquema 5.</b> Rota metabólica do chiquimato mostrando a biossíntese dos flavonoides em plantas, em que E são enzimas específicas que atuam nas reações (adaptado de Han et al., 2013 e Rosa et al., 2019).....	19
<b>Esquema 6.</b> Rota metabólica dos alcaloides pirrolizidínicos (adaptado de Dewick, 2009).....	21
<b>Esquema 7.</b> Esquema representativo da classificação dos semioquímicos.....	23
<b>Esquema 8.</b> Diagrama esquemático dos componentes de um espectrômetro de massas (fonte: Skoog et al., 2015).....	27

### CAPÍTULO 2

<b>Esquema 1.</b> Reação de derivatização entre o flavonoide daidzeína e o reagente derivatizante MSTFA.....	86
<b>Esquema 2.</b> Metodologia utilizada para extração dos compostos não voláteis de raízes, folhas e sementes de <i>Crotalaria spectabilis</i> .....	89
<b>Esquema 3.</b> Metodologia utilizada para derivatização (imagens pessoais) .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	mais ou menos
=	igual
<	menor
$\chi^2$	chi quadrado
%	porcentagem
acetil-CoA	acetil coenzima A
ACP	Análise de componentes principais
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
°C	graus Celsius
CA	Califórnia
CG-DEA	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de eletroantenografia
CG-DIC	Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama
CG-EM	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
cm	centímetro
COVs	Compostos orgânicos voláteis
DEA	Detector de eletroantenografia
DF	Distrito Federal
DMAPP	difosfato de dimetilalila
DMNT	( <i>E</i> )-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno
DNA	ácido desoxirribonucleico
E	enzimas
EAG	eletroantenografia
ESI(+)-MS	electrospray no modo de íon positivo
ESI(-)-MS	electrospray no modo de íon negativo
EUA	Estados Unidos da América
eV	elétron-volt

FBN	Fixação biológica de nitrogênio
FPP	difosfato de farnesila
g	grama
GC-EAD	<i>Gas chromatography coupled to electroantennographic detector</i>
GC-FID	<i>Gas chromatography with flame ionization detector</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>
GGPP	difosfato de geranylgeranila
gl	graus de liberdade
GLM	<i>Generalized linear model</i>
GOBPs	<i>General odorant binding proteins</i>
GPP	difosfato de geranila
h	hora
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Hz	hertz
IPP	difosfato de isopentenila
IR	Índice de retenção
L	litro
LC-MS	<i>Liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>
LOX	lipoxigenases
LQB	Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis
LSE	Laboratório de Semioquímicos
LTDA	Limitada
m	metro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MLG	Modelos lineares generalizados
mm	milímetro
mM	milimol
mV	milivolts

μL	microlitro
μm	micrômetro
MG	Minas Gerais
MIP	Manejo integrado de pragas
MS	espectros de primeira ordem
MS/MS	espectros de segunda ordem
MSI	<i>Metabolomics Standards Initiative</i>
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
m/z	razão massa/carga
N°	número
NC	Nível de Confiança
NI	Não identificado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ng	nanograma
nm	nanômetro
p	valor da probabilidade de uma dada distribuição
PA	Pensilvânia
PBPs	<i>Pheromone binding proteins</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PDA	<i>Photodiode array</i>
PEP	fosfoenolpiruvato
PI	padrão interno
ppm	partes por milhão
PTFE	politetrafluoretileno
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	ácido ribonucleico
R\$	real
SC	Santa Catarina
sp	espécie
SP	São Paulo

TMS	trimetilsilil
TMTT	( <i>E,E</i> )-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno
TR	Tempo de retenção
UHPLC-HRMS	<i>Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry</i>
US\$	dólar
UV	ultravioleta
V	volt
v/v	volume/volume
VBP	Valor Bruto da Produção Agropecuária
VPIHs	Voláteis de plantas induzidos por herbivoria

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A cultura do milho e sua principal praga, <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	3
2.2 Controle biológico de pragas.....	5
2.3 Leguminosas do gênero <i>Crotalaria</i> .....	7
2.4 A química das plantas - metabolismos primário e secundário.....	11
2.4.1 Terpenos.....	12
2.4.2 Voláteis de folhas verdes – Lipoxigenases.....	13
2.4.3 Compostos fenólicos.....	14
2.4.3.1 Ácidos fenólicos.....	15
2.4.3.2 Flavonoides.....	17
2.4.4 Alcaloides pirrolizidínicos.....	20
2.5 Ecologia química.....	22
2.6 Técnicas utilizadas na análise de metabólitos secundários de plantas.....	25
2.6.1 Cromatografias gasosa e líquida.....	25
2.6.2 Espectrometria de massas.....	27
2.7 Percepção dos odores pelos insetos e a técnica de eletroantenografia.....	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

### CAPÍTULO 1 - Influência dos compostos voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* e milho, na comunicação química com *Spodoptera frugiperda*.

1. INTRODUÇÃO.....	44
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo Geral.....	46
2.2 Objetivos Específicos.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Local.....	47
3.2 Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	47



3.3	<i>Cultivo de plantas</i> .....	47
3.4	<i>Coleta de voláteis</i> .....	48
3.5	<i>Análises químicas</i> .....	49
3.6	<i>Análises eletrofisiológicas</i> .....	51
3.7	<i>Bioensaio de oviposição em gaiolas</i> .....	52
3.8	<i>Preparo dos septos utilizados nos bioensaios em túnel de vento</i> .....	53
3.9	<i>Bioensaios em túnel de vento</i> .....	55
3.10	<i>Análises estatísticas</i> .....	56
3.11	<i>Origem dos compostos</i> .....	57
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	58
4.1	<i>Análises químicas por cromatografia gasosa</i> .....	58
4.2	<i>Análises eletrofisiológicas</i> .....	66
4.3	<i>Bioensaio de oviposição em gaiolas</i> .....	70
4.4	<i>Proporção de liberação dos compostos dos septos utilizados nos bioensaios em túnel de vento</i> .....	71
4.5	<i>Bioensaios em túnel de vento</i> .....	72
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	75
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81

CAPÍTULO 2 - Composição química dos metabólitos secundários não voláteis de *Crotalaria spectabilis*.

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	84
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	87
2.1	<i>Objetivo Geral</i> .....	87
2.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	87
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	88
3.1	<i>Local</i> .....	88
3.2	<i>Cultivo de plantas</i> .....	88
3.3	<i>Extração de compostos</i> .....	88
3.4	<i>Análises químicas dos extratos hidroetanólicos</i> .....	89
3.4.1	<i>Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por HPLC-UV</i> .....	89
3.4.2	<i>Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por UHPLC-HRMS</i> .....	90

3.4.3	<i>Análises dos espectros por UHPLC-HRMS</i> .....	91
3.4.4	<i>Análises quantitativas dos extratos hidroetanólicos por UPLC-PDA-ELSD</i> .....	91
3.5	<i>Derivatização</i> .....	92
3.6	<i>Análises químicas dos extratos derivatizados por GC-FID e GC-MS</i> .....	93
3.7	<i>Análises estatísticas</i> .....	94
3.8	<i>Origem dos compostos</i> .....	95
4.	RESULTADOS.....	96
4.1	<i>Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por HPLC-UV</i> .....	96
4.2	<i>Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por UHPLC-HRMS</i> .....	98
4.3	<i>Análises quantitativas dos extratos hidroetanólicos por UPLC-UV-ELSD</i> ..	107
4.4	<i>Análises químicas dos extratos derivatizados por GC-FID e GC-MS</i> .....	108
5.	DISCUSSÃO.....	114
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	127
	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	128
	APÊNDICE I.....	129
	APÊNDICE II.....	140
	APÊNDICE III.....	141
	APÊNDICE IV.....	145
	ANEXO I.....	147

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um grande protagonista na produção e na exportação de produtos agropecuários, o que contribui significativamente para o desenvolvimento econômico e social do país. Em 2021, o Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP) no Brasil atingiu R\$ 1,13 trilhão, 10,1% acima do valor alcançado em 2020, e estima-se que tenha um aumento de 2,9% em 2022. Desse valor, a agricultura e a pecuária representaram 68 e 32% do VBP, respectivamente (MAPA, 2022).

Um dos aspectos relevantes na agricultura atualmente são as perdas significativas na produção devido à incidência de pragas, cujos danos causados às diferentes culturas trazem grandes prejuízos econômicos aos agricultores. Estima-se que as perdas causadas por ataque de pragas e de patógenos possam atingir aproximadamente 40% do total produzido, tanto no Brasil quanto a níveis mundiais (Oliveira et al., 2014; Savary et al., 2019). Para controlar as pragas nas lavouras, os defensivos químicos ainda são muito utilizados. Porém, devido às suas desvantagens ambientais e de saúde pública, como riscos de contaminação de corpos hídricos superficiais e subterrâneos, e intoxicação por resíduos químicos nos alimentos (Carneiro et al., 2015), estratégias mais sustentáveis de manejo de pragas têm sido sugeridas com o objetivo de diminuir o uso excessivo de agrotóxicos. Métodos mais sustentáveis de manejo de pragas como o controle biológico com fungos, bactérias, parasitoides e predadores, e o uso de semioquímicos (compostos químicos responsáveis pela interação e comunicação química entre os organismos) têm sido fortalecidos e empregados no contexto do manejo integrado de pragas (MIP), com foco em minimizar os atuais níveis de utilização de agrotóxicos, e consequentemente, reduzir riscos sociais, ambientais e econômicos (Embrapa, 2018a).

Associado a isso, uma crescente demanda por produtos naturais tem se intensificado nas últimas décadas e estão sendo demandados cada vez mais para o manejo sustentável de insetos-praga na agricultura, por serem biodegradáveis e apresentarem menor risco ambiental (Rattan, 2010; Hernández-Suárez & Beitia, 2021). Adicionalmente aos bioinsumos, práticas agronômicas vêm sendo desenvolvidas como meio de obter uma agricultura mais sustentável, como a rotação de culturas utilizando leguminosas, que podem proporcionar uma perspectiva agrícola mais favorável à atração e manutenção de inimigos naturais nas áreas cultivadas, uma vez que funcionam como fonte de alimento através do pólen das flores, áreas de proteção e refúgio para os parasitoides e os predadores. Além disso, as leguminosas são muito utilizadas para adubação verde, pela

capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que conseqüentemente aumenta os níveis de nutrientes do solo diretamente e de matéria orgânica indiretamente, através da produção de biomassa (Berriel et al., 2020).

Em áreas de cultivo de milho no Brasil, pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo revelaram que leguminosas como a *Crotalaria juncea* L. (Fabales: Fabaceae) são as mais apropriadas para a cobertura do solo antes do cultivo das culturas comerciais, pois dentre as plantas de cobertura testadas, ela foi a que menos favoreceu a multiplicação e o estabelecimento da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)) no milho, com sobrevivência de apenas 7% em condições de casa de vegetação, e ainda exerceu influência direta sobre a presença de inimigos naturais, com aumento de 83% na presença de tesourinha (*Doru luteipes* Scudder, Dermaptera: Forficulidae), que é predador da lagarta-do-cartucho (Tavares et al., 2011; Dias et al., 2016; Viana, 2016).

Recentemente, em outro estudo, Blassioli-Moraes e colaboradores (dados não publicados) testaram em campo o efeito potencial da cultura armadilha e de outras plantas companheiras, em pragas de milho e seus inimigos naturais, em quatro tratamentos diferentes: (1) milho monocultivo (*Zea mays* L., Poales: Poaceae), (2) milho com feijão-guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp., Fabales: Fabaceae), (3) milho com capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach, Poales: Poaceae) e (4) milho com *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabales: Fabaceae). Dentre eles, as áreas com plantas de milho e *C. spectabilis* como cultura de bordadura apresentaram menor número de plantas de milho com injúria severa da lagarta-do-cartucho em comparação com os outros tratamentos. Esses resultados mostraram que há um efeito negativo sobre a população da lagarta no milho quando cultivado com *Crotalaria* sp. Porém, não se sabe os mecanismos envolvidos nesse processo, e por isso, é necessário conduzir novos estudos para entender essas interações.

Através desses estudos preliminares, pode-se inferir que plantas do gênero *Crotalaria* desempenham um importante papel nos programas de MIP, devido à sua influência sobre a população da lagarta-do-cartucho no milho. Então a hipótese é que quando o milho é cultivado com *Crotalaria* sp., esta tenha um perfil químico que interfere negativamente na quimiotaxia da mariposa para encontrar as plantas de milho.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito dos semioquímicos nas interações entre *C. spectabilis*, milho e a praga *S. frugiperda*. Para isto, foram conduzidos estudos para a identificação química do perfil de compostos voláteis e não

voláteis de *C. spectabilis*, com potencial de ação na defesa da planta, e que poderiam ter efeito no comportamento de *S. frugiperda* em relação ao milho. Sendo assim, o trabalho foi organizado de forma que no capítulo 1 foi avaliado se os perfis químicos de compostos voláteis das plantas de *C. spectabilis* e de milho mudam quando injuriadas por herbivoria de lagartas de *S. frugiperda*, e ainda, se estes voláteis agem na quimiotaxia da mariposa *S. frugiperda*. Já no capítulo 2, foi avaliado o perfil químico de compostos não voláteis das plantas de *C. spectabilis*, visando aplicações em estudos de Ecologia Química.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

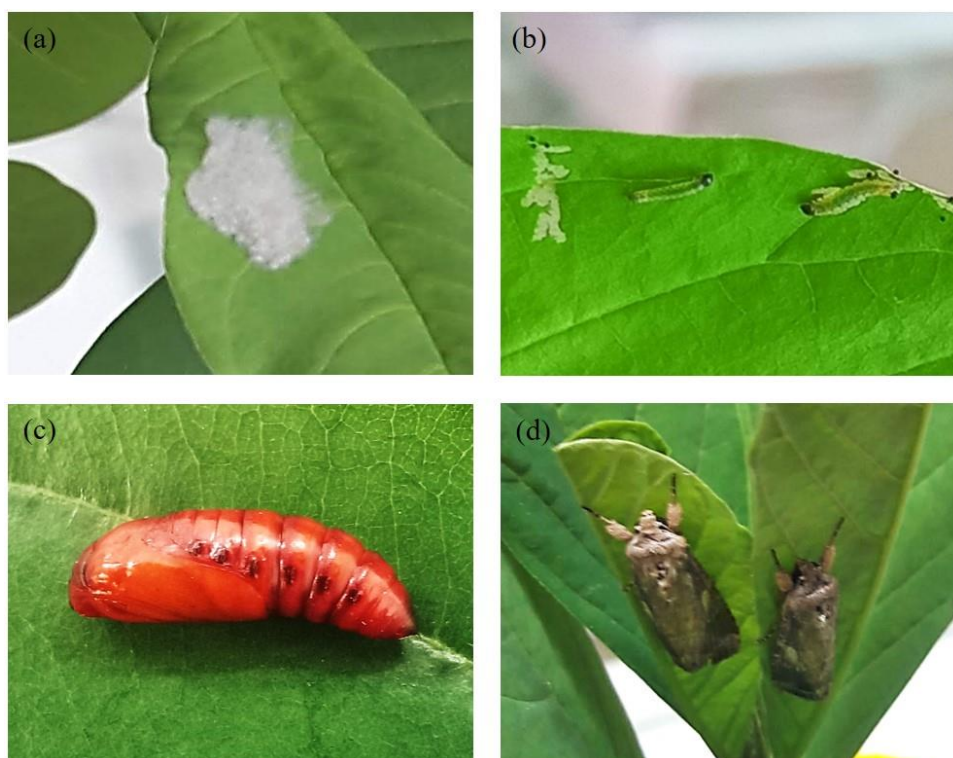
### 2.1 A cultura do milho e sua principal praga, *Spodoptera frugiperda*

O milho, *Zea mays* L. (Poales: Poaceae) é o cereal mais produzido no mundo, seguido do trigo e do arroz. Atualmente, cerca de 196,4 milhões de hectares são utilizados ao redor do mundo para a produção de milho, que gira em torno de 1133,9 milhões de toneladas. Na safra 2020/2021, os maiores produtores foram os Estados Unidos, a China e o Brasil, com 360,3, 260,7 e 109 milhões de toneladas, respectivamente (ABIMILHO, 2022). A produção de milho no Brasil encontra-se em segundo lugar, atrás apenas da soja, e em relação à safra 2019/2020, houve uma redução de aproximadamente 15% de produtividade do milho, que se deve principalmente às chuvas tardias no início do plantio, chuvas na colheita, secas, geadas e pragas (CONAB, 2021).

Devido ao ataque de pragas, a produtividade do milho pode ser reduzida em até 57%, dependendo da época do cultivo e do híbrido utilizado (Burtet et al., 2017). No Brasil, geralmente o milho é cultivado em duas épocas do ano na região Centro-Oeste (entre outubro e novembro, e de janeiro a abril), enquanto na região Sul, a época típica de plantio é de agosto a janeiro. Entretanto, o uso da irrigação permitiu a produção de milho sem interrupções, o que favorece o uso de milho Bt durante todo o ano no Brasil. O milho Bt é um milho transgênico que expressa proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (Bt), resistentes a várias lagartas da família Noctuidae, e assim contribuem na redução de pulverizações de inseticidas contra estas pragas. No entanto, o uso contínuo de plantas Bt sem o uso do refúgio recomendado, isto é, faixas de plantas não transgênicas, geram uma pressão de seleção sobre as populações-alvo das

proteínas Bt, favorecendo a evolução da resistência dessas pragas (Farias et al., 2014; Burtet et al., 2017).

Dentre as diversas pragas que podem atacar as plantações de milho, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), é a principal e mais destrutiva espécie de praga na América Latina e na América do Norte (Lima et al., 2021) e sua presença já foi confirmada nos continentes Africano (Niassy et al., 2021) e Asiático (Sun et al., 2021). Essa praga passa por quatro fases de desenvolvimento durante seu ciclo de vida: ovos, lagartas, pupas e adultos (mariposas). A fase que emerge do ovo (Figura 1a) é a lagarta (Figura 1b). Lagartas de *S. frugiperda* podem apresentar de cinco a sete instares, e geralmente a maioria apresenta seis (instar é o estágio de crescimento ou a forma do inseto entre duas mudas sucessivas, e a diferença entre os instares sucessivos é o aumento no tamanho que ocorre após cada muda). O fim do último instar marca o começo de uma fase pré-pupa. A pupa (Figura 1c) é contida dentro de um casulo de seda, e após esta fase, ocorre a emergência dos adultos (Figura 1d). O ciclo de vida do ovo ao adulto dura cerca de 30 dias, podendo variar de acordo com a temperatura (Gullan & Cranston, 2017; Du Plessis et al., 2020).



**Figura 1.** Fases de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae). **(a)** massa de ovos; **(b)** lagartas no final do segundo instar; **(c)** pupa; **(d)** adultos (mariposas) (imagens pessoais).

O ataque das lagartas de *S. frugiperda* pode causar injúrias significativas em todas as fases de desenvolvimento das plantas de milho. Por ter um comportamento alimentar polífago (a alimentação se dá por uma ampla variedade de plantas), esta lagarta apresenta um enorme potencial de dano também em outras culturas importantes para o Brasil, como soja, arroz, algodão, cana-de-açúcar e trigo (Oliveira et al., 2021; Truzi et al., 2021). Com isso, as consideráveis perdas econômicas causadas pela lagarta-do-cartucho levaram os produtores ao redor do mundo a contar com um manejo baseado no uso de inseticidas químicos organofosforados e piretróides (Toscano et al., 2012; Guan et al., 2021) e plantas geneticamente modificadas, que foram adotados como estratégias de controle de infestações. Porém, o uso excessivo de produtos químicos gera efeitos negativos ao meio ambiente, pois causam a morte de inimigos naturais e contribuem para a evolução da resistência de *S. frugiperda* à maioria desses inseticidas (Omoto et al., 2015; Faria et al., 2021).

Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de estratégias de controle mais sustentáveis para o sistema de cultivo de milho, inclusive para os pequenos agricultores, que são responsáveis por 12% da produção de milho no Brasil (Embrapa, 2022).

## 2.2 Controle biológico de pragas

O controle biológico é uma técnica que tem como objetivo o manejo de pragas agrícolas através do uso de seus inimigos naturais, que podem incluir outros insetos, predadores, parasitoides, e microrganismos como bactérias, fungos e vírus, e é uma ferramenta muito útil no manejo integrado de pragas (MIP). Como exemplo mais comum de bactérias, *B. thuringiensis* produz proteínas com propriedades tóxicas para insetos e inofensivas para humanos e outros vertebrados, e por isso é utilizada como pesticida biológico (Valicente, 2019). O fungo que se destaca por seu poder entomopatogênico é o *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae), que infecta o inseto, forma suas colônias e libera toxinas que estão envolvidas no bloqueio do desenvolvimento fisiológico, ou seja, o fungo impede o inseto de exercer suas funções vitais e pode levá-lo à morte (Peteira et al., 2011).

Ainda sobre os microrganismos, os baculovírus são vírus entomopatogênicos que, ao serem ingeridos pelo inseto, causam doença e subsequentemente morte (Paredes-Sánchez et al., 2021). Como inimigos naturais, o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é conhecido por sua eficiência no controle de diversas lagartas da ordem Lepidoptera, por possuírem capacidade de busca

mediada principalmente por estímulos químicos dos hospedeiros (Vargas et al., 2021). O parasitoide oviposita dentro dos ovos do hospedeiro, consome seus nutrientes e assim interrompe o ciclo do herbívoro logo no início do seu desenvolvimento, impossibilitando sua sobrevivência (Chen et al., 2021). Ainda sobre inimigos naturais, predadores como a tesourinha (*Doru luteipes* Scudder, Dermaptera: Forficulidae) são considerados agentes de controle biológico da lagarta-do-cartucho, por se alimentarem dos ovos e das lagartas em estágio inicial de desenvolvimento (Tavares et al., 2011; Dias et al., 2016).

Outra estratégia que vem sendo utilizada é a chamada “*push-pull*”, sistema de consórcio “atrai-repele”, que foi implementado com sucesso na cultura do milho no Quênia e utiliza semioquímicos *in natura*, isto é, as plantas liberam os semioquímicos que atuam no manejo e no controle de pragas e de seus inimigos naturais (Pickett & Khan, 2016). Esse sistema requer uma boa compreensão da ecologia química das interações planta-inseto nas diferentes culturas, pois utiliza plantas companheiras especificamente escolhidas, que são cultivadas entre e ao redor da cultura principal, com o objetivo de liberarem semioquímicos que repelem pragas da cultura principal (*push*) e atraem pragas para uma cultura armadilha (*pull*) (Cook et al., 2007; Khan et al., 2010). No sistema desenvolvido no Quênia para o manejo de pragas na cultura do milho, este foi consorciado com uma leguminosa (*Desmodium uncinatum* Jacq., Fabales: Fabaceae) e uma gramínea (*Pennisetum purpureum* Schum., Poales: Poaceae), em que a leguminosa libera compostos voláteis que repelem as mariposas (*Chilo partellus* Swinhoe, Lepidoptera: Crambidae) pragas do milho, ao mesmo tempo que a gramínea libera voláteis que atraem essas mariposas, as quais preferem ovipositar na gramínea ao invés de ovipositar nas plantas de milho. Adicionalmente, *D. uncinatum* além de proporcionar uma boa cobertura do solo, é uma leguminosa fixadora de nitrogênio, o que melhora a fertilidade do solo (Khan et al., 2008; Magalhães et al., 2020). Um outro estudo de campo utilizando a estratégia *push-pull* revelou que os voláteis de *Desmodium* spp. e *Brachiaria* spp. (Poales: Poaceae) utilizados como plantas de consórcio e bordadura influenciaram o comportamento das fêmeas de *S. frugiperda* ao reduzir a oviposição na cultura principal de milho, e ao atrair vespas parasitoides, ou seja, foi possível observar que a infestação de *S. frugiperda* e os níveis de danos foram substancialmente reduzidos ao utilizar o *push-pull* (Sobhy et al., 2022).

Além destas, existem outras estratégias propostas para o controle de lagartas do gênero *Spodoptera*, que estão relacionadas com o fato das plantas produzirem metabólitos como mecanismo de defesa, que podem ter um efeito inibitório sobre os insetos, atuando



como repelente, ovicida, inseticida, indutor de toxicidade celular, indutor de mortalidade, supressor reprodutivo, redutor de fertilidade e fecundidade e inibidor de crescimento (Paredes-Sánchez et al., 2021). Sendo assim, extratos de diferentes espécies de plantas têm sido utilizados no controle de pragas (Boulogne et al., 2012), por possuírem compostos com efeitos inseticidas, e quando usados no mesmo contexto em que são produzidos na natureza, em geral não são tóxicos ou apresentam menor toxicidade para espécies não-alvo do que os inseticidas químicos, como foi constatado por Pérez-Gutiérrez e colaboradores (2011). Estes autores demonstraram que o extrato de sementes de mamão em clorofórmio, com composição majoritária dos ácidos oleico, palmítico e esteárico, apresentou atividade inseticida contra *S. frugiperda*, sendo o ácido palmítico o agente mais ativo, seguido pelos ácidos oleico e esteárico. Portanto, a baixa toxicidade dos componentes do extrato e sua eficácia no controle de insetos são propriedades vantajosas, além de serem menos onerosas e mais seguras para o meio ambiente.

Da mesma maneira, diferentes espécies de *Crotalaria* sp. apresentaram um efeito negativo para as lagartas de *S. frugiperda*, tanto em laboratório como no campo, e os estudos sugerem que metabólitos secundários desta planta podem estar envolvidos neste efeito (Tavares et al., 2011; Blassioli-Moraes et al., dados não publicados).

### 2.3 Leguminosas do gênero *Crotalaria*

As leguminosas, pertencentes à família Fabaceae, são reconhecidas como a segunda maior família de plantas cultivadas com importância econômica, atrás somente da Poaceae (família do milho, arroz, trigo, sorgo, cana-de-açúcar, entre outros) (Tungmunnithum et al., 2021), e terceira maior família em número de espécies de plantas com flores, atrás da Orchidaceae e Asteraceae (Asfaw & Abebe, 2021; Jha et al., 2022). Entre os representantes de grande interesse econômico dessa família, estão a soja, o feijão e a crotalária, visto que a soja e o feijão são as leguminosas mais produzidas no Brasil (Albuquerque et al., 2022; Oliveira Neto et al., 2022), e a crotalária é umas das plantas mais utilizadas na adubação verde (Berriel et al., 2020).

Pertencentes à subfamília Papilionoideae e com cerca de 600 espécies já identificadas, *Crotalaria* sp. são plantas herbáceas, arbustivas, eretas, pouco ramificadas e geralmente com flores na coloração amarela (Figura 2b), e podem ser encontradas nas áreas tropicais da África, América, Ásia e Austrália, sendo originárias da Índia (Pacheco & Silva-López, 2010; Sudanich et al., 2017).

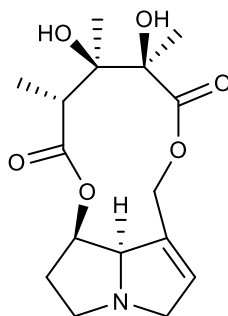


**Figura 2.** Plantas de *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabales: Fabaceae) com aproximadamente (a) 45 dias após a germinação e (b) 4 meses após a germinação, na fase floral (imagens pessoais).

Plantas desse gênero são conhecidas por apresentarem efeitos nematicidas, que vêm sendo estudados desde 1928, após Godfrey ter observado que *Crotalaria juncea* L. (Fabales: Fabaceae) tinha baixa infecção pelos nematoides *Meloidogyne* spp (Tylenchida: Heteroderidae) (Wang et al., 2002). Desde então, diversas espécies de *Crotalaria* sp. foram testadas ao longo dos anos visando o manejo de diferentes espécies de nematoides. Em destaque, quando as espécies *C. juncea*, *C. retusa* e *C. spectabilis* foram utilizadas como plantas de cobertura, foi relatado que os nematoides economicamente mais importantes (*Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines* e *Globodera rostochiensis*) foram suprimidos com sucesso (Wang et al., 2002; Thoden & Boppré, 2010). Dessa forma, plantas desse gênero têm sido muito utilizadas no controle populacional de nematoides como plantas armadilhas, visto que, apesar deles penetrarem as raízes, foi demonstrado uma redução nas taxas de reprodução e desenvolvimento das fêmeas (Wang et al., 2001), além de ter sido confirmado que *C. juncea* e *C. spectabilis* reduzem a densidade populacional de nematoides (Kushida et al., 2003).

Isso se deve aos efeitos dos compostos tóxicos que as plantas de *Crotalaria* sp. produzem, e podem influenciar negativamente no desenvolvimento de outros indivíduos, e neste caso, refletem em impactos prejudiciais das plantas na relação com o microrganismo (Wang et al., 2002). A classe dos alcaloides pirrolizidínicos possui elevada toxicidade (Mattocks, 1968; Wiedenfeld, 2011) e está presente em altas concentrações nas espécies de *Crotalaria* sp. Tendo o composto monocrotalina (Figura 3) como alcaloide majoritário nas sementes de *C. spectabilis*, Scupinari e colaboradores (2020) concluíram que a alta quantidade desse composto pode estar correlacionada com

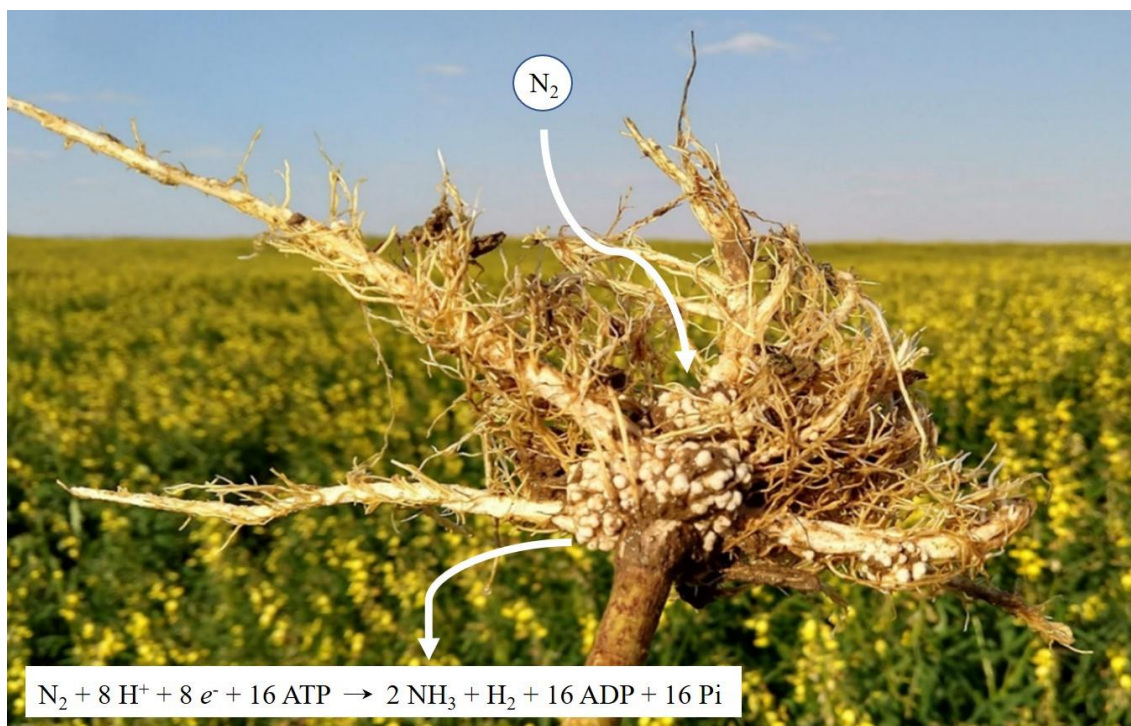
a toxicidade observada em nematoides endoparasitários, e avaliaram o uso de *C. spectabilis*, dentre outras do mesmo gênero, como um importante método natural para combater a densidade populacional de nematoides e consequentemente aumentar a produtividade agrícola, especialmente para as lavouras de soja, milho (Souza et al., 2019; Galeano et al., 2021), café (Rosado et al., 2021) e algodão (Inomoto, 2016) no Brasil.



**Figura 3.** Estrutura química da monocrotalina.

Além disso, as plantas do gênero *Crotalaria* são muito empregadas como plantas de cobertura ou adubação verde, técnica que consiste no plantio de espécies vegetais em rotação ou em consórcio com outras culturas de interesse econômico, na intenção de enriquecer o solo (Mercante et al., 2014; Silva et al., 2021). Esse enriquecimento do solo ocorre devido à alta capacidade da crotalária em fixar nitrogênio da atmosfera, através da associação simbiótica com bactérias do solo que são fixadoras de nitrogênio, conhecidas como rizóbios, que disponibilizam nitrogênio às plantas por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Embrapa, 2005; Sprent et al., 2017; Berriel et al., 2020).

Nas leguminosas, esse processo acontece dentro dos nódulos radiculares (Figura 4), que alojam as bactérias especializadas em realizar a conversão de  $N_2$  atmosférico em  $NH_3$ , através da ação da enzima nitrogenase (Christophe et al., 2011), e é um processo energeticamente dispendioso: 16 moléculas de ATP e 8 pares de elétrons produzem apenas 2 moléculas de  $NH_3$ , o que torna o processo estritamente regulado, de modo que a amônia seja produzida apenas quando necessária (Khare & Yadav, 2017; Nelson & Cox, 2019).



**Figura 4.** Nódulos radiculares de *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabales: Fabaceae) ricos em nitrogênio (adaptado de Nelson & Cox, 2019 e Prado, 2022).

Essa relação de simbiose é de suma importância, visto que o nitrogênio é o elemento mineral que as plantas necessitam em maiores quantidades, o que o torna limitante para o crescimento e o desenvolvimento das plantas e para a produção agrícola em todo o mundo (Christophe et al., 2011; Hoffman et al., 2014; Taiz et al., 2017). Como resultado dessa simbiose, quantidades significativas de nitrogênio tornam-se disponíveis após o corte da leguminosa (Espíndola et al., 2004), contribuindo para uma autossuficiência desse elemento, e consequentemente, reduzindo a necessidade da aplicação de fertilizantes nitrogenados sintéticos, o que é vantajoso por ser um recurso natural e renovável (Almeida, 2012).

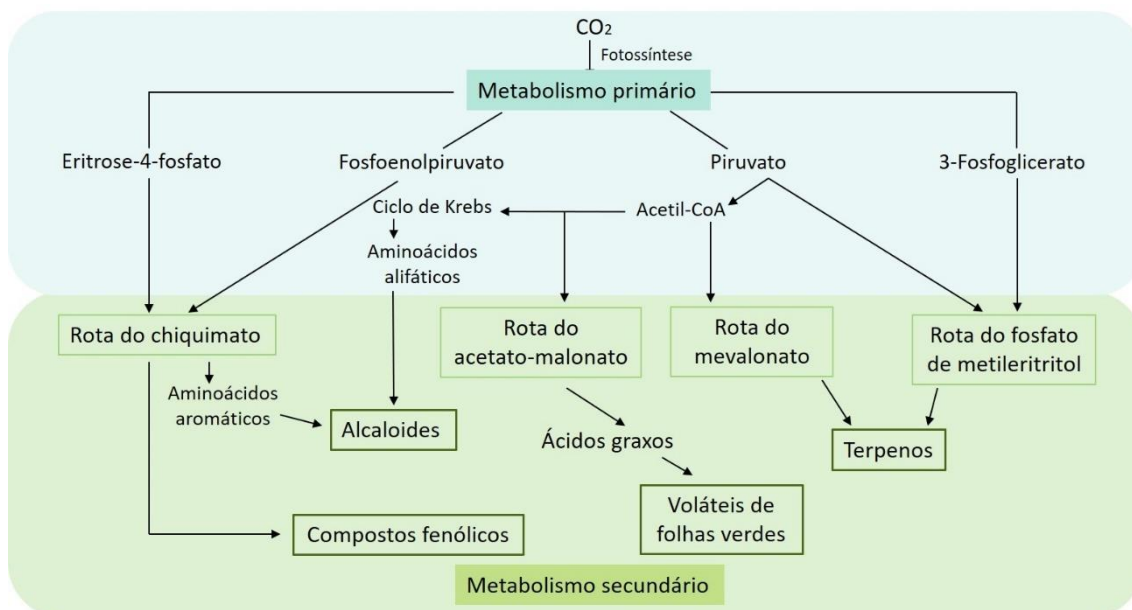
Atualmente a FBN está presente em 75% da área cultivada de soja no Brasil (Embrapa, 2018b), através da inoculação das sementes de soja com bactérias fixadoras de nitrogênio, que resulta em uma economia estimada em US\$ 14,4 bilhões por safra, além da contribuição ambiental, ao diminuir a emissão de gases de efeito estufa e reduzir a lixiviação de nitrato para rios, reservatórios de água, lençóis freáticos e lagos (Garcia et al., 2021).

#### *2.4 A química das plantas - metabolismos primário e secundário*

Os organismos vivos sintetizam um grande número de compostos orgânicos para que possam viver, crescer e se reproduzir, os quais são classificados como metabólitos primários e secundários (Dewick, 2009). Nas plantas, os metabólitos primários são compostos diretamente relacionados com o seu crescimento e desenvolvimento, como por exemplo os aminoácidos, as proteínas, os açúcares e as enzimas. Já os metabólitos secundários, por serem compostos espécie-específicos, expressam individualidade às espécies, e estão na interface entre o metabolismo primário e a interação dos organismos com o ambiente, regulando as interações benéficas, como atração de polinizadores, agindo como moduladores da resposta ao estresse abiótico, e desempenhando um papel fundamental no mecanismo de defesa das plantas contra herbívoros e patógenos, além de poderem apresentar efeitos negativos sobre o crescimento e o desenvolvimento de outros organismos, sendo assim, considerados como tóxicos (Taiz et al., 2017; Erb & Kliebenstein, 2020). A formação destes compostos ocorre através de reações químicas reguladas e mediadas por enzimas, denominadas vias ou rotas metabólicas, conforme demonstrado pelo Esquema 1 (Dewick, 2009).

Os blocos de construção empregados na biossíntese dos metabólitos secundários são derivados do metabolismo primário, dos quais são provenientes os intermediários acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e fosfato de metileritritol, que são utilizados nas rotas do acetato-malonato, do chiquimato, do mevalonato e do fosfato de metileritritol (Dewick, 2009).

Os metabólitos secundários mais estudados em plantas são pertencentes às classes dos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Taiz et al., 2017; Erb & Kliebenstein, 2020).



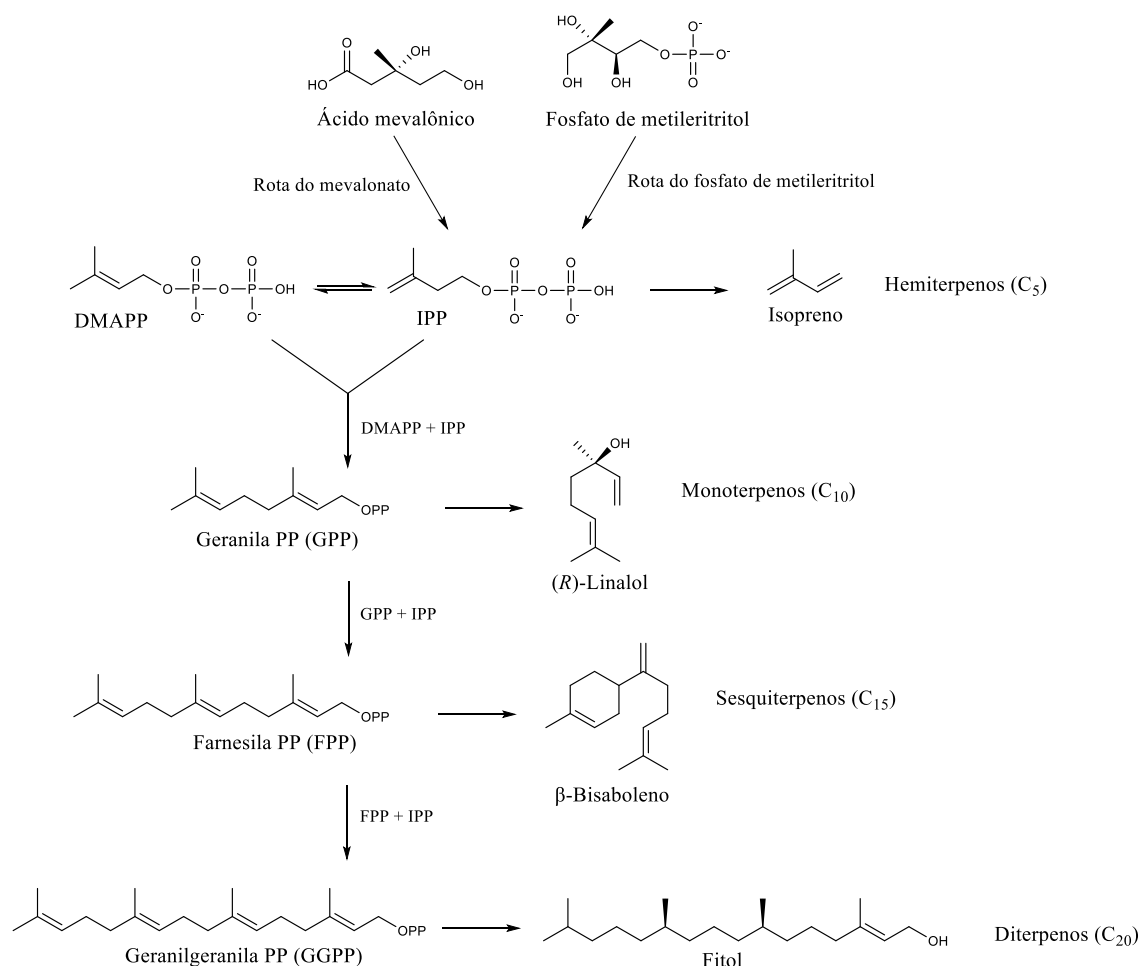
**Esquema 1.** Esquema simplificado das rotas do metabolismo secundário e suas relações com o metabolismo primário (adaptado e modificado de Taiz & Zeiger, 2002).

#### 2.4.1 Terpenos

Os terpenos constituem a maior classe de produtos naturais, com mais de 95000 compostos com vasta diversidade química e estrutural (Christianson, 2017; Faylo et al., 2021), e possuem uma ampla gama de aplicações biotecnológicas (Frank & Groll, 2017), por apresentarem propriedades anticancerígena, antimicrobiana e antioxidante (Couillaud et al., 2021). Nas plantas, os terpenos podem atuar nas interações de atração a polinizadores e como mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos (Dudareva et al., 2013; Kantsa et al., 2019).

A biossíntese dos terpenos nas plantas é compartimentalizada e pode ocorrer tanto no citosol, através da rota metabólica do mevalonato, como no plastídio, através da rota metabólica do fosfato de metileritritol (Dudareva et al., 2013; Zhao et al., 2013; Frank & Groll, 2017). Os terpenos são originados do bloco de construção que envolve os precursores de cinco carbonos difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP), ambos análogos de isopreno (Esquema 2). Cada unidade de IPP e DMAPP pode ser ligada à outra através de reações de condensação, combinando duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades de isopreno, e que são classificadas dependendo do número de unidades de isopreno combinadas, como: hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) (Dewick, 2009; Frank & Groll, 2017; Couillaud et al., 2021). A combinação de IPP e DMAPP catalisada por enzimas gera o difosfato de geranila (GPP),

precursor na formação dos monoterpenos. Já os sesquiterpenos são formados a partir da adição de uma unidade de IPP ao GPP, que leva à formação do difosfato de farnesila (FPP), e os diterpenos surgem do difosfato de geranilgeranila (GGPP), que é formado pela adição de mais uma unidade de IPP ao FPP (Dewick, 2009), conforme apresentado no Esquema 2.

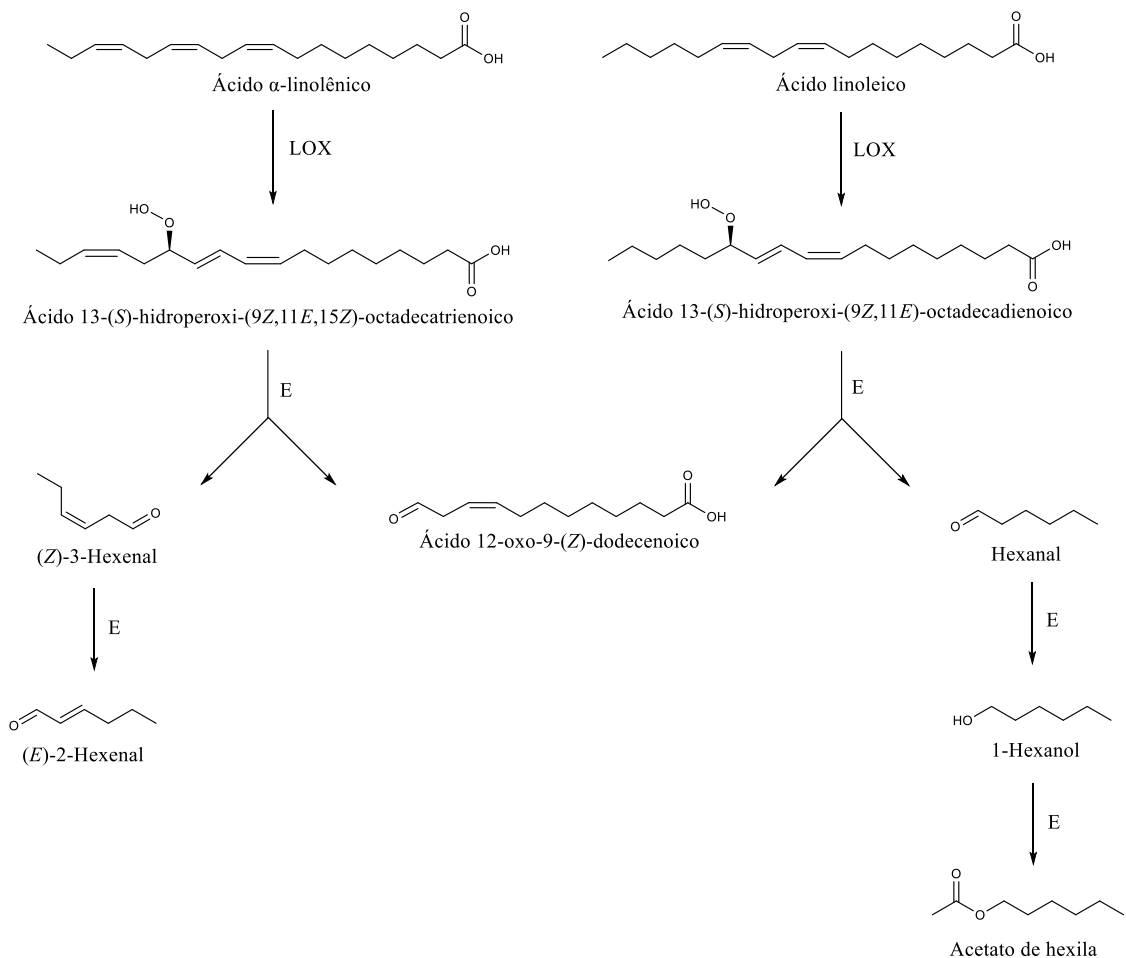


**Esquema 2.** A biossíntese dos terpenos ocorre através de duas rotas metabólicas (rota do mevalonato e rota do fosfato de metileritritol), nomeadas a partir do seu respectivo intermediário de reação (esquema adaptado de Dewick, 2009).

#### 2.4.2 Voláteis de folhas verdes – Lipoxigenases

Outra via existente na síntese de metabólitos secundários de plantas é a rota das lipoxigenases. As lipoxigenases (LOX) são enzimas distribuídas em plantas e animais superiores, que utilizam como substrato os ácidos graxos poli-insaturados ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico, e a partir deles, são responsáveis pela biossíntese de aldeídos, álcoois e ésteres de seis carbonos (Esquema 3), que são emitidos principalmente quando as folhas são danificadas, e por isso são conhecidos como voláteis de folhas verdes (Silva et al., 2001; Pinto-Zevallos et al., 2013; Vincenti et al., 2019).





**Esquema 3.** Rota metabólica das lipoxigenases, em que LOX são enzimas lipoxigenases que oxigenam ácidos graxos insaturados, e E são enzimas específicas que atuam nas reações subsequentes (esquema adaptado de Lin et al., 2019).

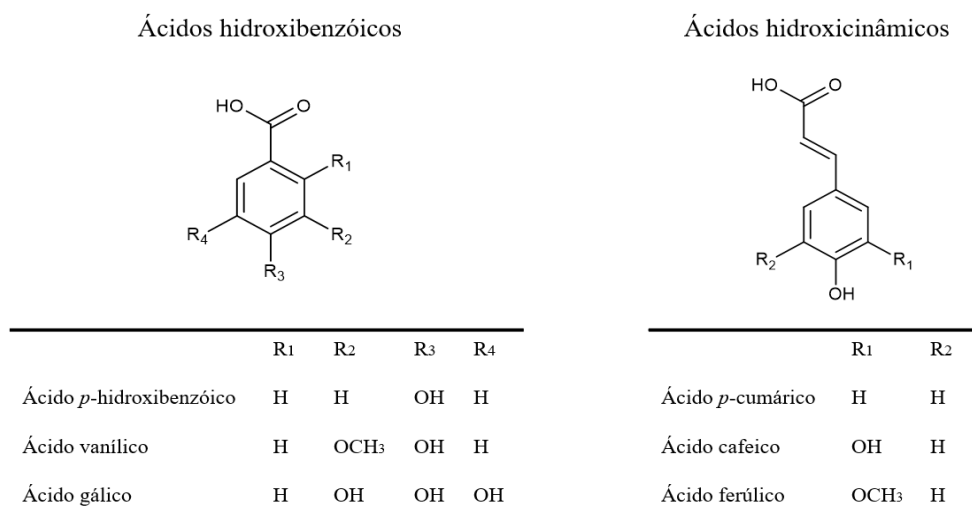
### 2.4.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser derivados das rotas do chiquimato e do acetato-malonato, que possuem respectivamente ácido chiquímico e acetil-CoA como intermediários de reação (Dewick, 2009; Nabavi et al., 2020). Os compostos fenólicos representam um grupo muito abundante de compostos orgânicos no reino vegetal, possuem grande variabilidade estrutural, com pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila, e apresentam diferentes atividades na planta, como suporte estrutural, proteção contra radiação solar ultravioleta (UV), e proteção contra estresse biótico (herbívoros e patógenos) ou abiótico (temperatura e deficiência hídrica) (Rosa et al., 2019). Os compostos fenólicos mais importantes em plantas podem ser pertencentes aos ácidos fenólicos e aos flavonoides.



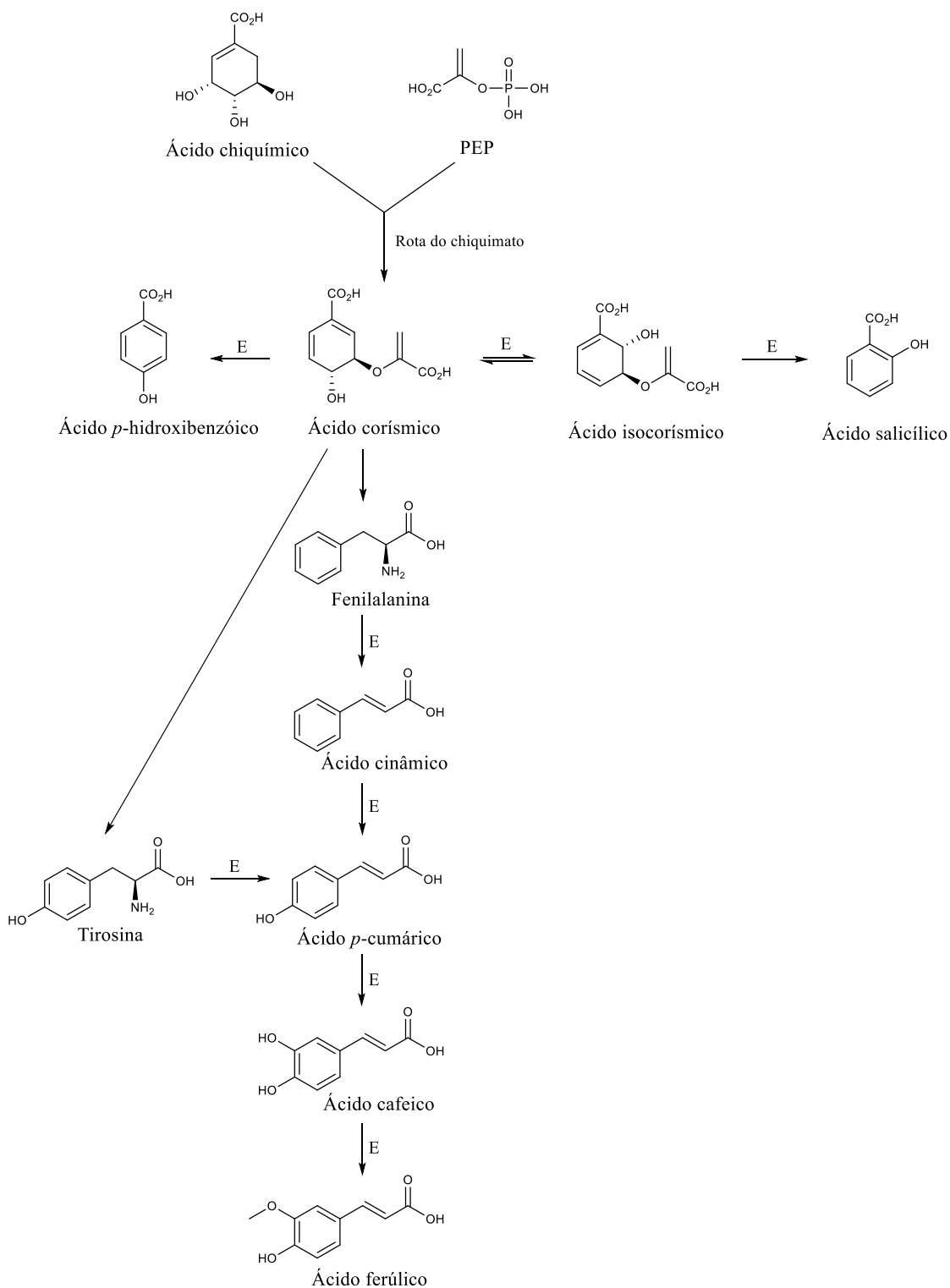
### 2.4.3.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos contêm um único grupo fenil com um grupo carboxílico e um ou mais grupos OH, diferindo entre eles o comprimento da cadeia que contém o grupo carboxílico, podendo ser divididos em ácidos hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos e outros hidroxifenílicos (Figura 5) (Rosa et al., 2019).



**Figura 5.** Exemplos de ácidos fenólicos e suas estruturas químicas.

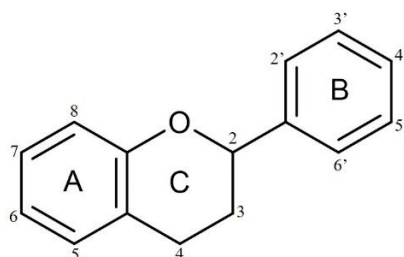
Nas plantas, a rota biossintética dos ácidos fenólicos envolve a presença dos substratos fenilalanina e tirosina, provenientes da rota do chiquimato, a principal responsável pela síntese dos precursores da maioria dos fenólicos vegetais (Rosa et al., 2019; Mondo et al., 2022). Na rota do chiquimato, o ácido corísmico é produzido a partir da reação de uma molécula de fosfoenolpiruvato (PEP) com o ácido chiquímico (Esquema 4). A partir do ácido corísmico e do seu isômero posicional, ácido isocorísmico, são produzidos compostos como o ácido *p*-hidroxibenzóico e o ácido salicílico, respectivamente, através de uma reação de eliminação do grupo O-C<sub>3</sub>O<sub>2</sub>H (Dewick, 2009). Esses dois ácidos são muito comuns nas mais diferentes espécies de plantas, e estão envolvidos com o seu sistema de defesa (Pieterse et al., 2009; López-Ráez et al., 2010).



**Esquema 4.** Rota metabólica do chiquimato mostrando uma parte da biossíntese dos ácidos fenólicos, em que E são enzimas específicas que atuam nas reações (adaptado de Dewick, 2009 e Rosa et al., 2019).

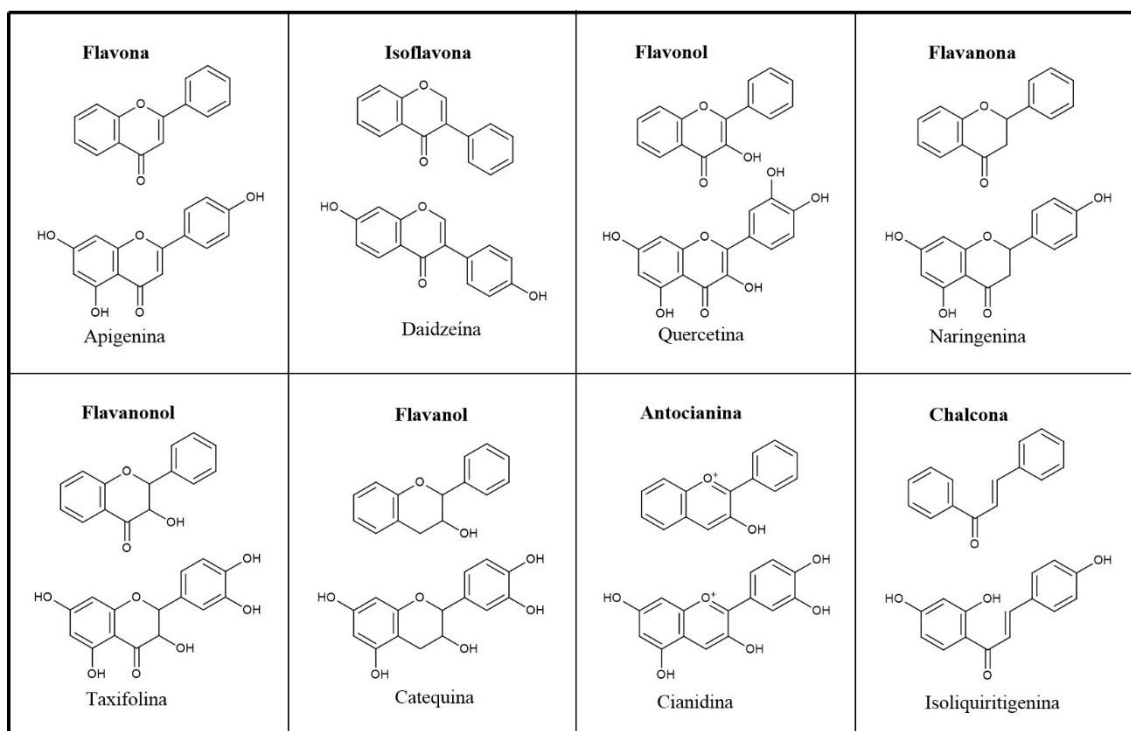
#### 2.4.3.2 Flavonoides

Os flavonoides possuem como estrutura básica dois anéis fenil (A e B) unidos por um anel pirano heterocíclico (C) (Figura 6), e podem ser divididos em subgrupos, de acordo com as diferenças no anel pirano, classificados em: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis (ou dihidroflavonóis), flavanois, antocianinas e chalconas (Panche et al., 2016; Rosa et al., 2019; Nabavi et al., 2020).



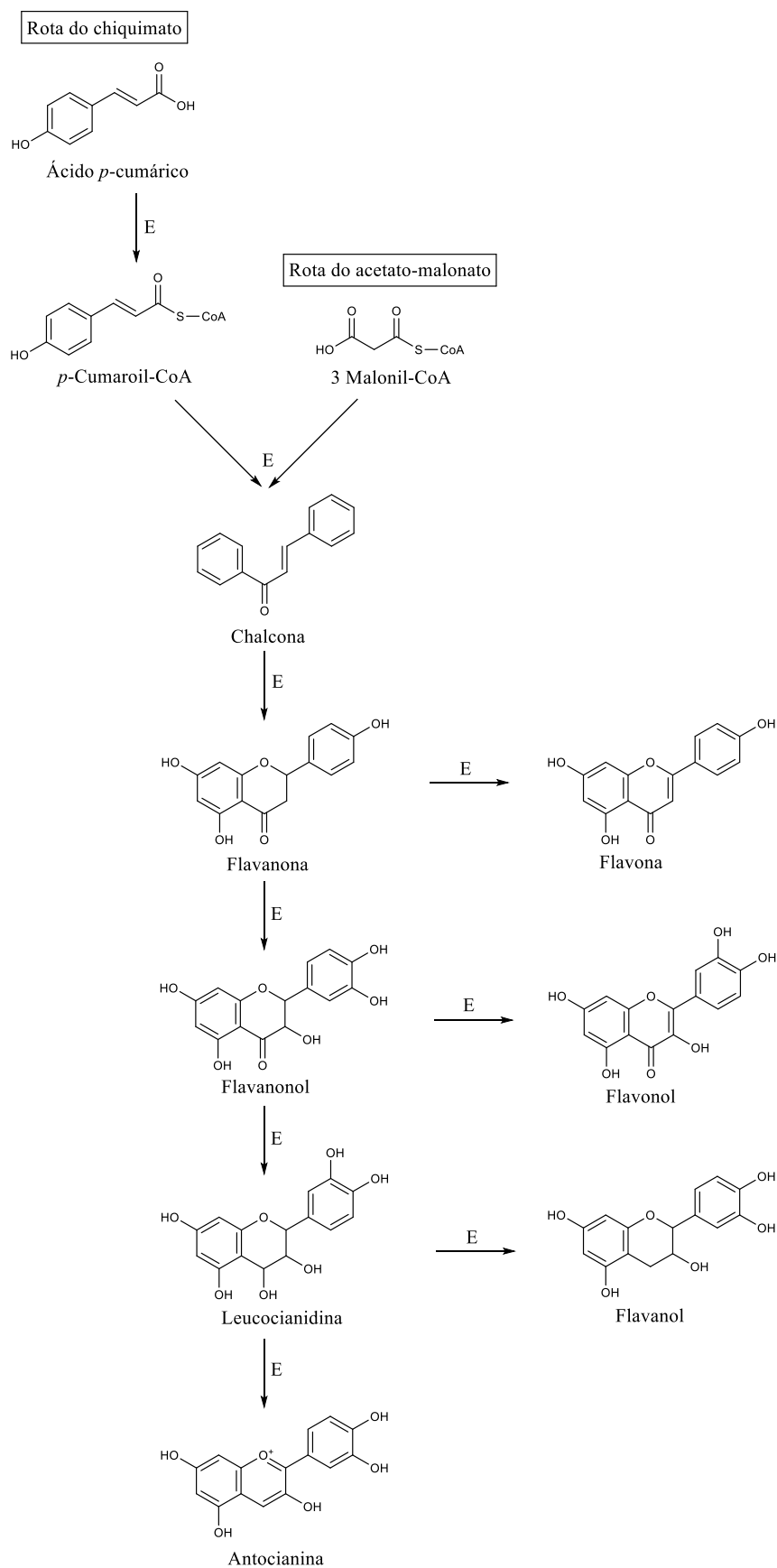
**Figura 6.** Estrutura geral básica dos flavonoides.

As flavonas são a estrutura mais básica dos flavonoides, com uma cetona em C4, uma ligação dupla entre C2 e C3 e o anel B ligado em C2, enquanto nas isoflavonas o diferencial é que o anel B está ligado em C3. Representando esses subgrupos, temos apigenina e daidzeína, respectivamente. Os flavonóis são flavonas hidroxiladas em C3, e têm como exemplo importante a quercetina. As flavanonas e os flavanonóis (ou dihidroflavonóis) possuem o anel C saturado e uma cetona em C4, mas o diferencial é que os flavanonóis possuem um grupo OH em C3. A naringenina e a taxifolina são dois exemplos desses subgrupos, respectivamente. Quando a estrutura possui o anel C saturado e não possui a cetona em C4, é considerada um flavanol, tendo como representante principal a catequina. Também sem a cetona em C4 existe o subgrupo das antocianinas, que apresenta como característica um grupo OH em C3 e duas ligações duplas no anel C, o que as deixam sendo os únicos flavonoides iônicos, e possuem a cianidina como exemplo. E por fim, as chalconas são caracterizadas pela ausência do anel C, e possuem a isoliquiritigenina como um exemplo desse subgrupo, que também pode ser chamado de flavonoide de cadeia aberta (Figura 7) (Dewick, 2009; Panche et al., 2016; Rosa et al., 2019). Vale ressaltar que diferentes posições de substituintes nos flavonoides resultam em propriedades químicas e físicas distintas, levando a atividades biológicas variáveis (Nabavi et al., 2020).



**Figura 7.** Estrutura básica dos subgrupos de flavonoides e seus respectivos exemplos.

A biossíntese dos flavonoides ocorre através de duas rotas diferentes: rota do acetato-malonato (formação do anel A) e rota do chiquimato (formação dos anéis B e C). O anel A é sintetizado a partir de três moléculas de malonil-CoA, enquanto os anéis B e C são sintetizados a partir de *p*-cumaroil-CoA produzido a partir da fenilalanina pela rota do chiquimato (Esquema 4). A condensação dos anéis A e B gera chalcona, que posteriormente sofre ciclização para formar flavanona, que é utilizada como composto de partida para a síntese de outros flavonoides (Esquema 5) (Nabavi et al., 2020).

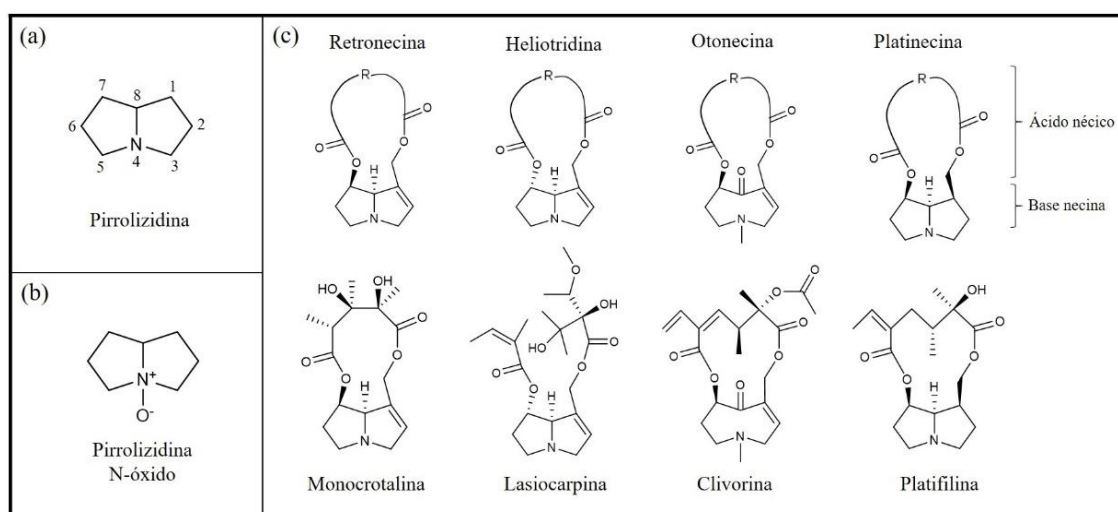


**Esquema 5.** Rota metabólica do chiquimato mostrando a biossíntese dos flavonoides em plantas, em que E são enzimas específicas que atuam nas reações (adaptado de Han et al., 2013 e Rosa et al., 2019).

#### 2.4.4 Alcaloides pirrolizidínicos

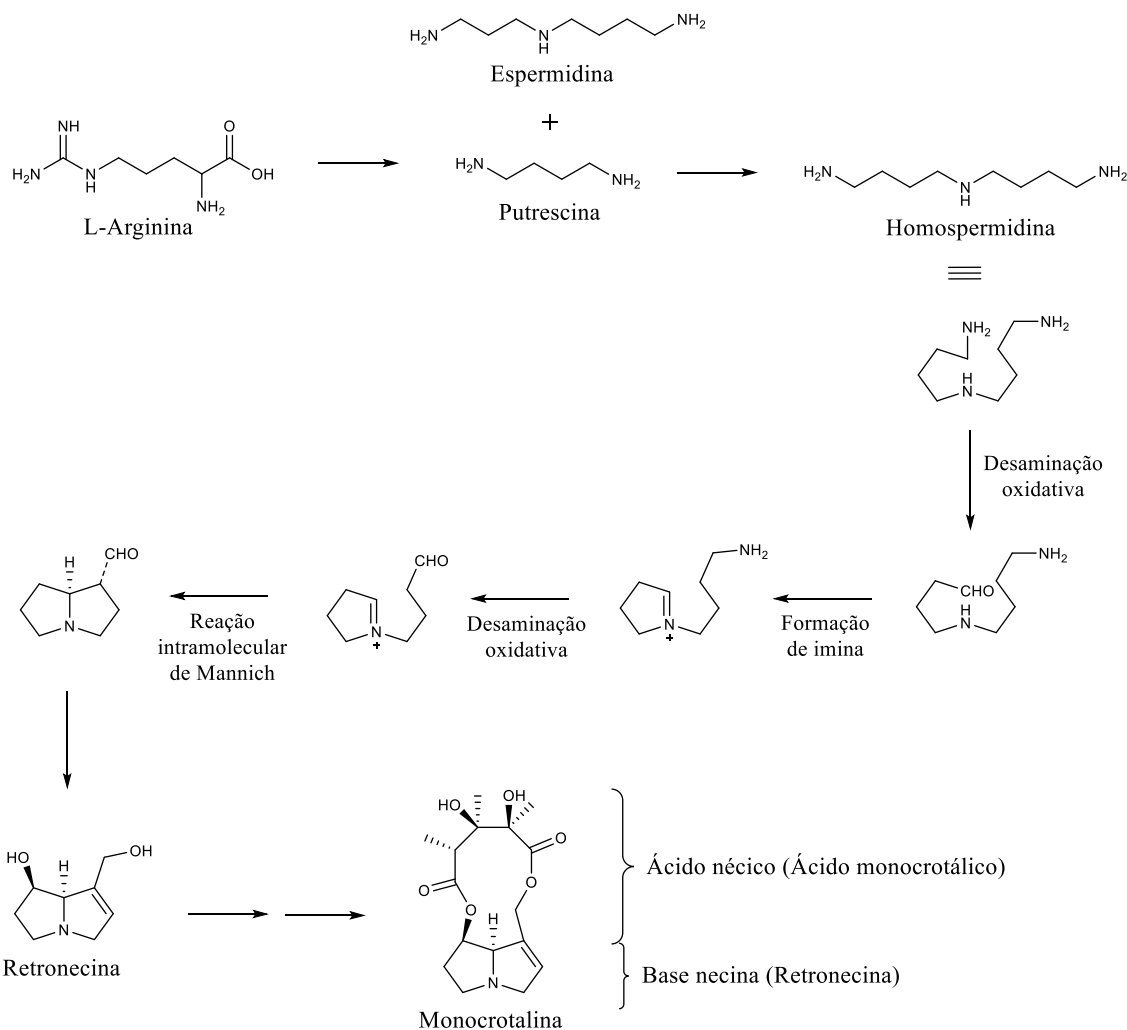
Outra classe de metabólitos secundários envolvidos na defesa das plantas é a classe dos alcaloides. Estes são originados de aminoácidos, apresentam estruturas cíclicas complexas com pelo menos um átomo de nitrogênio e geralmente exibem basicidade (Dewick, 2009). Os alcaloides produzidos pelas plantas do gênero *Crotalaria* pertencem à classe dos alcaloides pirrolizidínicos e estão presentes principalmente em suas sementes (Flores et al., 2009). Também são consideradas fitotoxinas produzidas constitutivamente por mais de 6.000 espécies de plantas, e muitos destes compostos agem na defesa da planta contra herbívoros e podem ser considerados perigosos para diferentes espécies de animais (Ober & Kaltenecker, 2009; Schramm et al., 2019; He et al., 2021).

Os alcaloides pirrolizidínicos (Figura 8) são bases necinas esterificadas com ácidos néicos, na qual as bases necinas consistem em um hidrocarboneto alifático bicíclico com dois anéis fundidos de cinco membros, unidos por um átomo de nitrogênio, que raramente ocorrem em sua forma livre (pirrolizidina – Figura 8a) (Dewick, 2009; Schramm et al., 2019). São agrupados em quatro tipos: retronecina, heliotridina, otonecina e platinecina (Figura 8c), e os tipos que possuem uma ligação dupla entre os carbonos 1 e 2 da base necina são considerados altamente tóxicos (Ma et al., 2018; He et al., 2021). Esses compostos também podem se acumular na planta como N-óxidos polares (Figura 8b), facilitando seu transporte e mantendo-os em uma forma menos tóxica (Dewick, 2009; Schramm et al., 2019).



**Figura 8.** (a) Estruturas básicas da pirrolizidina, (b) do N-óxido e (c) dos quatro tipos de alcaloides pirrolizidínicos retronecina, heliotridina, otonecina e platinecina, com seus respectivos exemplos monocrotalina, lasiocarpina, clivorina e platifilina.

A biossíntese da estrutura bicíclica da pirrolizidina é iniciada a partir de putrescina e espermidina, que são derivadas do aminoácido arginina, e juntas, formam a homospermidina. A partir da homospermidina e uma sequência de reações, o esqueleto da pirrolizidina é formado, passando por desaminação oxidativa, formação de imina e reação intramolecular de Mannich. Em seguida, a retronecina é formada através de desnaturação e hidroxilação por enzimas (Dewick, 2009; Schramm et al., 2019). Enquanto as bases necinas são sintetizadas pela mesma rota metabólica (Esquema 6), os diferentes ácidos nécicos são formados por rotas metabólicas específicas (como por exemplo, o ácido monocrotálico é formado a partir do aminoácido L-leucina), e a junção da base necina com o ácido nécico para a formação do alcaloide pirrolizidínico geralmente ocorre através da esterificação dos grupos hidroxí da base necina com os ácidos nécicos (Schramm et al., 2019).



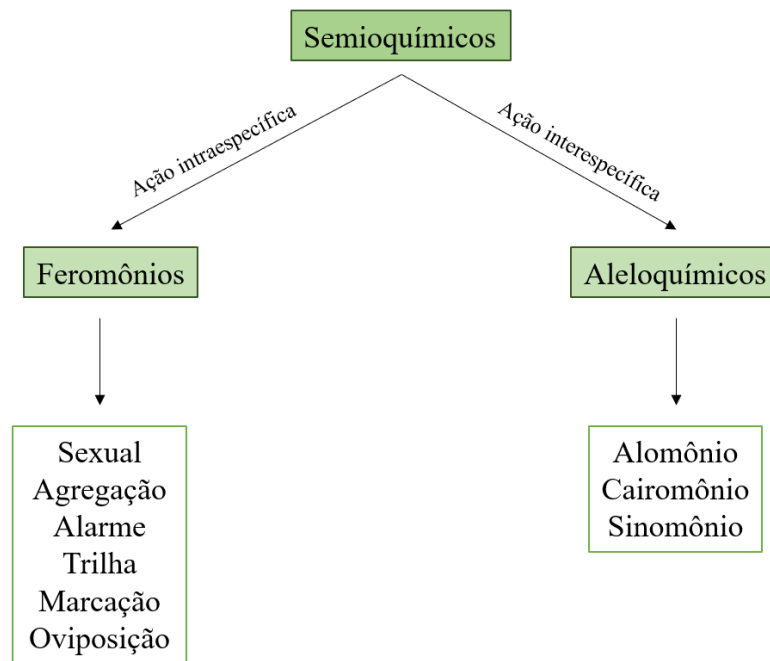
**Esquema 6.** Rota metabólica dos alcaloides pirrolizidínicos (adaptado de Dewick, 2009).

## 2.5 Ecologia química

Todos os organismos usam sinais químicos para transmitir informações (Bergström, 2007). A área que explora as interações intra e interespecíficas entre os organismos e seu ambiente, mediadas por compostos químicos, é um campo interdisciplinar entre a biologia e a química, conhecido como ecologia química (Bergström, 2007; Kuhlisch & Pohnert, 2015). Essa área de grande potencial e rápido crescimento se expandiu ao longo das décadas e atualmente inclui estudos como a investigação de voláteis de plantas, feromônios, hidrocarbonetos cuticulares de insetos, enzimas de desintoxicação e compostos que medeiam interações entre populações de plantas, microrganismos, animais e fungos (Dyer et al., 2018).

As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os seres vivos são chamadas de semioquímicos, palavra que vem do grego *semîon*, e significa sinais. Quando essas substâncias atuam nas interações intraespecíficas, são denominadas feromônios (do grego *pherein*, que significa carregar e *horman*, estimular), e quando atuam nas interações interespecíficas, são denominadas aleloquímicos (do grego *allel*, que significa outro) (Esquema 7). Os tipos de feromônios mais estudados são o sexual e o de agregação, mas também existem outros tipos como o de alarme, trilha, marcação e oviposição. Já os aleloquímicos, por estarem envolvidos nas interações entre organismos de espécies diferentes, são subdivididos de acordo com o organismo beneficiado na interação: alomônio, quando o composto químico medeia uma interação que beneficia o emissor; cairomônio, quando beneficia o receptor; e sinomônio, quando o benefício é para ambos. Desta forma, os alomônios geralmente são substâncias de defesa dos seres vivos, como os metabólitos secundários de plantas ou substâncias repelentes produzidas pelos demais organismos. Já os cairomônios estão relacionados com as interações entre presa-predador ou parasitoide-hospedeiro, com alto potencial de uso no manejo de pragas. E os sinomônios podem ser representados pelos voláteis florais e nectários extraflorais, que atraem os polinizadores, ou os voláteis de fungos, que atraem insetos dispersores de esporos (El-Shafie & Faleiro, 2017; Brezolin et al., 2018; Sharma et al., 2019; Magalhães et al., 2020).



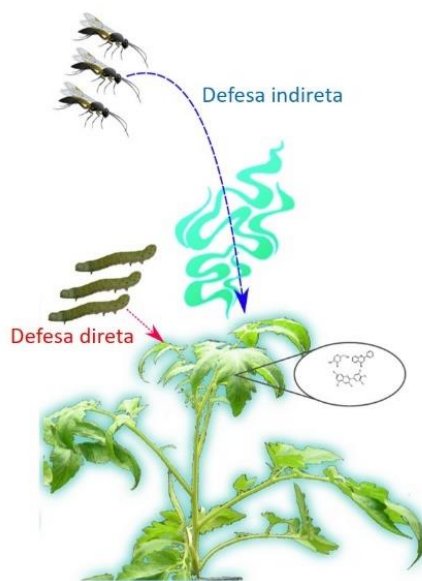


**Esquema 7.** Esquema representativo da classificação dos semioquímicos.

Com relação à produção, emissão e utilização dos semioquímicos, os insetos e as plantas são alguns dos organismos mais estudados. Compreender as interações, determinar quais são as substâncias bioativas e elucidar suas estruturas são etapas importantes para entender os mecanismos da comunicação, que começam a partir da percepção do sinal químico. Isso é fundamental para entender as relações inseto-inseto, planta-planta e inseto-planta, e serve como base para a pesquisa aplicada, que viabiliza o uso de semioquímicos como um método valioso no manejo e no controle de pragas (Kuhlisch & Pohnert, 2015).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa para reduzir os danos devido ao ataque dos insetos. A defesa da planta contra a herbivoria de insetos pode ser desencadeada direta ou indiretamente (Michereff et al., 2021), de modo que a planta pode atuar intoxicando o herbívoro por meio da sua defesa direta, ou pode agir como defesa indireta através de sinais de atração de inimigos naturais, como parasitoides e predadores (Figura 9) (McCormick et al., 2012; Turlings & Erb, 2018; Bouwmeester et al., 2019), portanto agindo neste último exemplo como sinomônios, uma vez que a defesa indireta gera um benefício para as plantas e para os inimigos naturais (Dicke & Baldwin, 2010). Em um contexto de interação inseto-planta, por exemplo, já foi comprovado em diversos estudos que uma das principais formas da planta responder à herbivoria é através da

emissão de compostos voláteis que são induzidos pela herbivoria e desempenham papel fundamental na defesa da planta (Pearse et al., 2020; Prada et al., 2021).



**Figura 9.** Quando uma planta sofre herbivoria e gera efeitos prejudiciais no herbívoro, é considerada defesa direta, e quando ela emite compostos que atraem inimigos naturais do herbívoro, é considerada defesa indireta da planta (adaptado de Coppola et al., 2018).

Os semioquímicos de insetos, microrganismos e plantas são compostos já existentes na natureza, mas que podem também ser sintetizados em laboratório para utilização em campo, por meio de liberadores que simulam a taxa e a concentração emitidas pelos organismos. E essa utilização no monitoramento e controle de pragas vem crescendo na agricultura (Magalhães et al., 2020). De acordo com a Fortune Business Insights (2021), o mercado global de semioquímicos foi de US\$ 3,30 bilhões em 2020, e está projetado para atingir US\$ 9,70 bilhões até 2028, com os feromônios sendo utilizados em maiores proporções em comparação aos aleloquímicos (Figura 10).

Participação no mercado global de semioquímicos



**Figura 10.** Gráfico representativo da proporção de semioquímicos na participação no mercado global (fonte: Fortune Business Insights, 2021).

Vale ressaltar que o uso de feromônio não elimina a praga, mas as técnicas de uso de feromônio contribuem para a manter a população da praga abaixo do nível de dano econômico (Magalhães et al., 2020). E os aleloquímicos, apresentam uma crescente utilização e eficácia no controle de ervas daninhas (Gaffke et al., 2021) e pragas agrícolas, podendo ser utilizados como extratos de plantas e culturas de consórcio (Kong et al., 2019). Sendo assim, estes semioquímicos têm sido utilizados em tecnologias na agricultura para monitorar e controlar o nível populacional de pragas com eficiência, contribuir no manejo da resistência de pragas perante o inseticida ao minimizar o seu uso indiscriminado, e no aumento populacional de parasitoides e predadores (Saha & Chandran, 2017; Borges & Blassioli-Moraes, 2017; Magalhães et al., 2020; Hernández-Suárez & Beitia, 2021). Além disso, possuem a vantagem de serem eficientes em pequenas quantidades, na faixa de poucos miligramas por hectare (Borges et al., 2011), e por fim, contribuem com a redução de resíduos químicos no ambiente e nos alimentos, consequentemente gerando uma agricultura mais sustentável e menos nociva ao meio ambiente (Sharma et al., 2019).

## *2.6 Técnicas utilizadas na análise de metabólitos secundários de plantas*

### *2.6.1 Cromatografias gasosa e líquida*

A cromatografia é um método utilizado para a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Todas as separações cromatográficas têm em comum o uso de uma fase estacionária e uma fase móvel, em que os componentes da amostra são transportados através da fase estacionária, pelo fluxo da fase móvel, e as separações ocorrem de tal forma que os componentes que interagem mais fortemente com a fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel, enquanto os componentes que interagem mais fracamente com a fase estacionária, movem-se mais rapidamente (Holler et al., 2009; Skoog et al., 2015). Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida para as análises de metabólitos secundários de plantas. Essas duas técnicas utilizam colunas como fase estacionária, e como fase móvel, utilizam gases inertes e solventes líquidos, respectivamente.

Na cromatografia gasosa, a amostra é introduzida em uma coluna capilar por meio de um sistema de injeção, em que o uso de temperaturas convenientes possibilita a vaporização dos compostos presentes na amostra, visto que essa técnica é amplamente

empregada na análise de compostos voláteis e termicamente estáveis (Collins et al., 2006). Quando a amostra é vaporizada, ela é introduzida em uma corrente de gás que passa continuamente pela coluna, e dessa forma, os compostos presentes na amostra, depois de separados pela coluna, chegam ao detector, que gera um sinal proporcional à concentração de cada composto na amostra, obtendo-se então uma série de picos, que juntos formam um cromatograma, útil em análises quantitativas e qualitativas (Collins et al., 2006; Skoog et al., 2015).

Na cromatografia líquida, são empregadas colunas empacotadas com materiais especialmente preparados e de partículas pequenas (geralmente 1 a 10  $\mu\text{m}$ ), e uma fase móvel líquida, eluída sob altas pressões com o auxílio de uma bomba. A amostra também é introduzida na coluna por meio de um sistema de injeção, mas diferentemente da cromatografia gasosa, a amostra deve estar no estado líquido e deve ser solúvel na fase móvel (Collins et al., 2006). Essa técnica é adequada para a análise de compostos de média a alta polaridade, baixa volatilidade e termicamente instáveis (Silva & Collins, 2011). Similarmente à cromatografia gasosa, os compostos passam separadamente pelo detector, possibilitando a obtenção de um cromatograma.

Os detectores utilizados nessas duas técnicas são específicos e adequados para cada uma. Na cromatografia gasosa, o mais empregado é o detector de ionização em chama, em que as moléculas da amostra são pirolisadas na chama, ocorrendo a formação de íons, que são coletados por um eletrodo e detectados; mas também existem o detector de condutividade térmica e o detector de captura de elétrons (Collins et al., 2006).

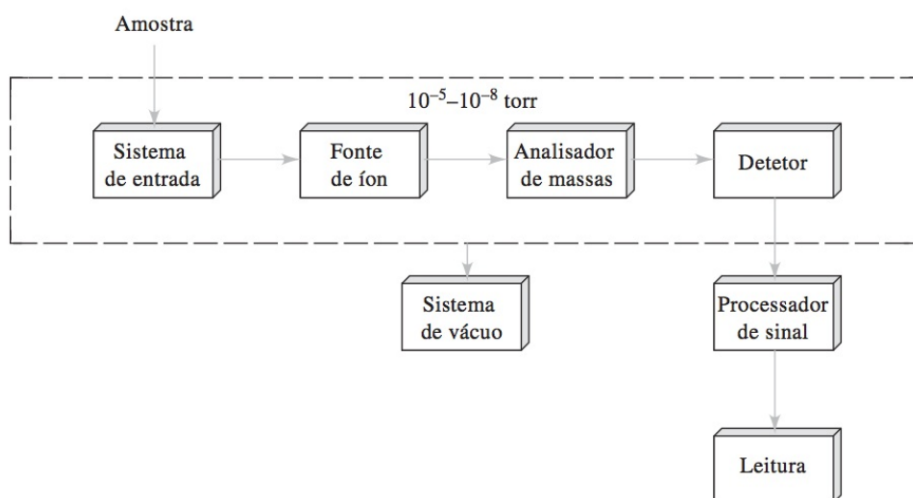
Já na cromatografia líquida, os detectores mais amplamente empregados são baseados na absorção de radiação no ultravioleta ou no visível (UV-Vis), mas também existem outros tipos como detectores por fluorescência, por índice de refração, por espalhamento de luz e eletroquímicos (Collins et al., 2006; Skoog et al., 2015). O detector UV-Vis apresenta boa sensibilidade, baixo limite de detecção e é estável a mudanças na composição da fase móvel. Porém, para a sua utilização, é necessário que os analitos tenham cromóforos, que são grupos funcionais orgânicos que absorvam na região do UV-Vis (Vervoort et al., 2008; Skoog et al., 2015). Alternativamente, o detector evaporativo com espalhamento de luz (ELSD, do inglês *evaporative light scattering detector*) pode ser empregado na análise de compostos que não possuem cromóforos ou que tenham grupos cromóforos fracos, como por exemplo, carboidratos, lipídeos, saponinas e alcaloides (Gonzalez et al., 2011). Esse detector também é empregado na detecção de analitos pouco voláteis e termicamente estáveis, e o seu princípio de operação

consiste na nebulização do eluente da coluna, evaporação da fase móvel para gerar partículas sólidas do analito, que em seguida atravessam um feixe de radiação eletromagnética, e a intensidade da luz espalhada pelas partículas do analito gera um sinal proporcional ao número de fótons espalhados, que são então detectados (Collins et al., 2006; Gonzalez et al., 2011).

Além destes anteriormente citados, um dos mais poderosos detectores utilizados em ambas as cromatografias é o espectrômetro de massas, por permitir a identificação dos compostos, mesmo quando presentes a nível de traços (Collins et al., 2006).

### 2.6.2 Espectrometria de massas

As cromatografias gasosa e líquida acopladas à espectrometria de massas são muito utilizadas na análise metabólica, visto que os métodos combinam suas vantagens de alta resolução do sistema cromatográfico e alta sensibilidade dos espectrômetros de massas (Zeki et al., 2020). Nessa técnica, a amostra sólida, líquida ou gasosa é introduzida através do sistema de entrada, e então os componentes da amostra precisam ser convertidos em íons em fase gasosa através do bombardeamento com elétrons, fótons, íons ou moléculas, na fonte de ionização. Em seguida, os íons são acelerados para o analisador de massas, que os separa de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Então, os íons chegam no detector e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados, para produzir o espectro de massas (gráfico do número de íons detectados em função de sua razão  $m/z$ ) (Esquema 8) (Skoog et al., 2015; Pavia et al., 2016).



**Esquema 8.** Diagrama esquemático dos componentes de um espectrômetro de massas (fonte: Skoog et al., 2015).

Na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, o do fluxo gasoso que sai do cromatógrafo é admitido na câmara de ionização do espectrômetro de massas. Do mesmo modo, na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, as substâncias que eluem da coluna passam pela câmara de ionização e são detectadas pelo espectrômetro de massas. Os espectros de massas são então analisados e comparados a espectros encontrados em bibliotecas espectrais (Pavia et al., 2016).

Na cromatografia gasosa, o método de ionização mais comum é a ionização por elétrons, em que as moléculas em fase gasosa são bombardeadas por um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV), e assim remove-se um elétron da molécula, criando um cátion radical, conhecido como íon molecular (Silverstein et al., 2019). As vantagens desse método de ionização são que a energia transmitida para a amostra leva a uma fragmentação significativa de íons moleculares e o padrão de fragmentação de um composto é reprodutível, e por isso existem muitas bibliotecas espectrais de dados, o que simplifica o processo de determinação ou de confirmação da identidade de um composto. Em contrapartida, existem desvantagens como o fato de alguns compostos serem muito facilmente fragmentados, tornando o tempo de vida do íon molecular muito curto para ser detectado pelo analisador de massa, além do fato de que a amostra deve ser relativamente volátil para entrar em contato com o feixe de elétrons, o que dificulta a análise de compostos de alto peso molecular (Pavia et al., 2016).

No caso da cromatografia líquida, as moléculas neutras em solução precisam ser convertidas em íons em fase gasosa. O método de ionização mais comum é chamado *electrospray*, em que a solução com as moléculas neutras da amostra é borrifada pela ponta de um capilar fino com potencial de alta voltagem em sua superfície, para dentro de uma câmara aquecida. Assim, é formado um aerossol com pequenas gotículas carregadas, que passam por um contrafluxo de um gás de secagem (em geral, nitrogênio), para evaporar o solvente das gotículas, até que os íons da amostra fiquem na fase gasosa. No *electrospray*, podem ser formados íons positivos e negativos (Pavia et al., 2016). A vantagem desse método de ionização é sua utilidade para estudar biomoléculas de baixo a alto peso molecular e outros compostos lábeis ou não voláteis, enquanto a desvantagem é a falta de reprodutibilidade dos padrões de fragmentação, visto que os espectros de massas gerados dependem da energia utilizada, que não costuma ser fixa como na ionização por elétrons, e devido à isso, as bibliotecas espectrais não são tão bem desenvolvidas (Zeki et al., 2020). Outros tipos de fonte de ionização podem ser consultados na Tabela 1.

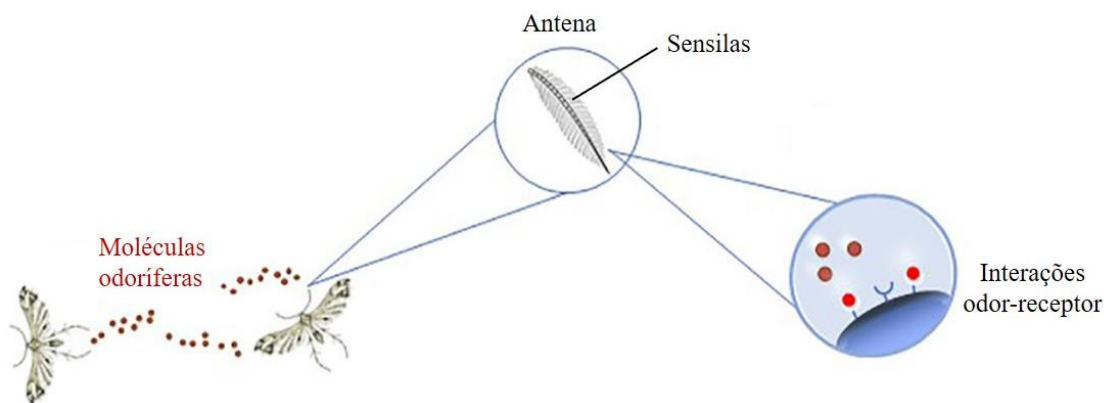
**Tabela 1.** Fontes de ionização e analisadores de massa utilizados na espectrometria de massas.

	Fontes de ionização	Analisadores de massa
Fase gasosa	Ionização por elétrons (EI)	Setor magnético (B)
	Ionização química (CI)	Quadrupolar (Q)
Dessorção	Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)	Armadilha de íons (IT)
	Espectrometria de massa de íon secundário (SIMS)	Ressonância de íon ciclotron (ICR)
	Bombardeamento rápido de átomos (FAB)	Tempo de voo (TOF)
	Ionização por dessorção a laser assistido por matriz (MALDI)	
	Ionização por electrospray (ESI)	
	Ionização por termospray (TSI)	

Já os analisadores de massas podem ser comuns às duas cromatografias. Neste trabalho, foram utilizados os analisadores quadrupolar e tempo de voo, mas existem outros tipos, conforme listado na Tabela 1. O analisador de massa quadrupolar consiste em quatro barras cilíndricas paralelas na direção do feixe de íons, que atuam como filtros de massas, e permitem apenas a passagem de íons de determinadas razões  $m/z$ , que possuem uma trajetória estável. Barras opostas entre si são conectadas a voltagens de corrente contínua e de radiofrequência, gerando um campo eletrostático oscilante na região entre as barras, de forma que é criado um caminho estável para os íons passarem através do analisador para o detector (Skoog et al., 2015; Pavia et al., 2016). Já no analisador por tempo de voo, os íons são acelerados por um potencial, e possuem energias cinéticas aproximadamente iguais, de forma que os íons de massas diferentes terão velocidades diferentes, variando de forma inversamente proporcional, ou seja, os íons com baixa razão  $m/z$  chegam ao detector mais rapidamente que aqueles com alta razão  $m/z$  (Skoog et al., 2015; Pavia et al., 2016; Silverstein et al., 2019).

### *2.7 Percepção dos odores pelos insetos e a técnica de eletroantenografia*

As interações ecológicas entre insetos e plantas podem ocorrer através da percepção de semioquímicos. A comunicação química para os insetos é essencial para sua sobrevivência, e é através do reconhecimento das moléculas odoríferas que os insetos encontram os parceiros sexuais, locais de oviposição, alimentação e percebem os inimigos. Essa percepção ocorre através de quimiorreceptores olfativos presentes nas sensilas, estruturas sensoriais na forma de pelos, que processam a informação do odor e são localizadas principalmente nas antenas dos insetos (Figura 11) (De Bruyne & Baker, 2008).



**Figura 11.** Esquema do processo de comunicação química, com a percepção do odor pelos receptores olfativos presentes nas sensilas das antenas dos insetos (esquema adaptado de Elgar et al., 2018).

É através dos poros presentes nas sensilas que ocorre a difusão de substâncias químicas odoríferas do meio externo para os receptores olfativos (Matiello, 2008). As moléculas odoríferas são geralmente hidrofóbicas, enquanto nas sensilas a linfa sensiliar é aquosa. Assim, ao entrarem na sensila, as moléculas de odores são ligadas a receptores, que são proteínas específicas que transportam as moléculas odoríferas hidrofóbicas para a membrana dendrítica onde ocorre a transdução do sinal para os neurônios (Shiota & Sakurai, 2020).

Existem diferentes proteínas ligantes de odores, como por exemplo, as proteínas de ligação a feromônio (PBPs, do inglês *pheromone binding proteins*), que ligam-se especificamente aos componentes do feromônio, e as proteínas que se ligam a odores em geral (GOBPs, do inglês *general odorant binding protein*), como os semioquímicos de plantas (Leal et al., 2005; De Bruyne & Baker, 2008). Além de atuarem como transportadores, GOBPs e PBPs também contribuem para a especificidade da detecção dos compostos voláteis, através de ligações seletivas (Renou, 2014). As proteínas ligantes de feromônio são capazes de reconhecer quantidades diminutas, e podem ser altamente específicas, se ligando somente ao isômero correto, podendo distinguir a configuração absoluta do feromônio, entre *R* e *S*, ou configuração geométrica, *cis* e *trans*, por exemplo (Zhang et al., 2016; Elgar et al., 2018).

Sabendo-se que os insetos percebem odores por meio das sensilas nas antenas, é possível identificar quais são os compostos químicos que as antenas possuem receptores através de uma técnica chamada eletroantenografia (EAG). Essa técnica utiliza a antena do inseto como um biossensor, que ao entrar em contato com compostos estimulantes ao

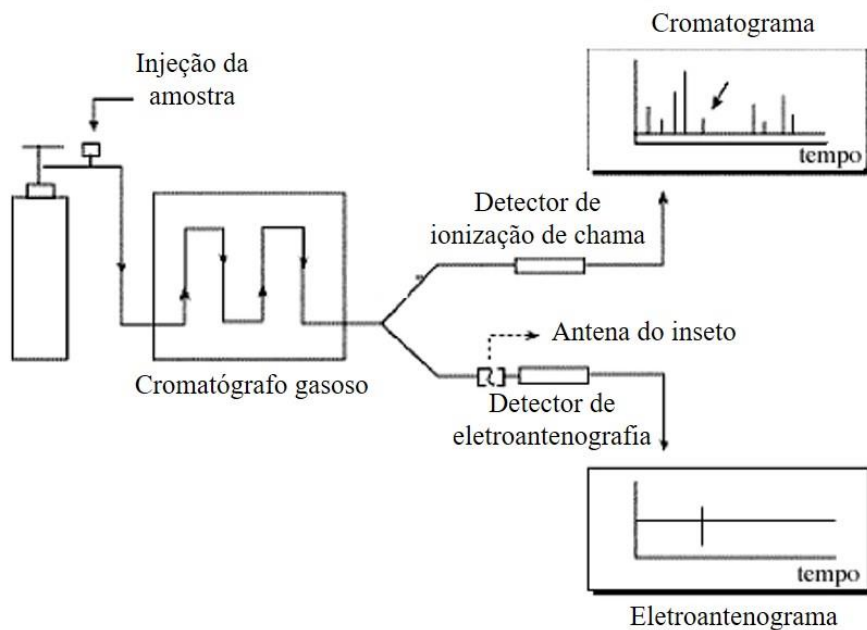


inseto, sofre despolarizações, registrando uma variação do potencial elétrico (Blassioli-Moraes et al., 2008).

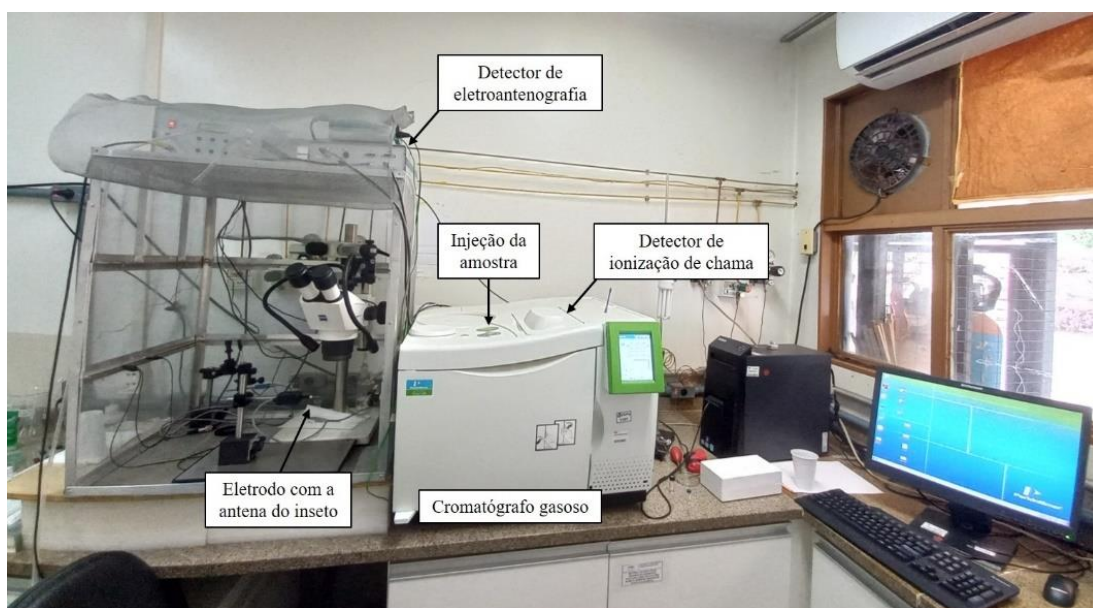
O primeiro estudo eletrofisiológico foi realizado em 1957 por Schneider, que mediu a resposta da antena de machos da mariposa *Bombyx mori* Linneau (Lepidoptera: Bombycidae) ao feromônio sexual produzido pelas fêmeas coespecíficas. Para isto a antena do macho foi cortada e colocada entre dois eletrodos, sendo que a parte apical da antena, onde está a maior parte da sensilas, foi fixada no eletrodo de trabalho, e a parte basal foi fixada no eletrodo de referência (aterrado). Uma solução salina foi usada para fechar o circuito e o sistema foi conectado a um osciloscópio. Quando a antena recebeu um “puff” de uma solução contendo o feromônio sexual da fêmea houve a despolarização da antena e uma deflexão negativa de poucos milivolts foi observada no osciloscópio (Cork et al., 1990).

Já em 1969, Moorhouse e colaboradores conduziram o primeiro experimento acoplando o detector de eletroantografia (DEA ou EAD, do inglês *electroantennographic detector*) a um cromatógrafo gasoso. Para o acoplamento, o fluxo da coluna foi dividido, assim uma parte do fluxo era direcionada para o detector de ionização de chama do cromatógrafo gasoso e a outra parte para o detector de eletroantografia na antena do inseto, obtendo a resposta de forma simultânea nos dois detectores, o que se chamou de cromatografia gasosa acoplada ao detector de eletroantografia (CG-DEA ou GC-EAD, do inglês *gas chromatography coupled to electroantennographic detector*) (Figuras 12 e 13).

No geral, a resposta da antena do inseto é da ordem de poucos milivolts, muitas vezes menor que 1 mV, assim é necessário amplificar e digitalizar o sinal usando sistemas eletrônicos e transdutores específicos. Com esta técnica, é possível fazer a análise de misturas de voláteis complexas obtidas de insetos ou plantas, e com isso identificar quais são os compostos com potencial de alterarem o comportamento dos insetos (Blassioli-Moraes et al., 2008).



**Figura 12.** Esquema representativo de um sistema GC-EAD, demonstrando a divisão do fluxo da coluna para o detector de ionização de chama e para o detector de eletroantenografia (adaptado de Zarbin et al., 1999).



**Figura 13.** Sistema GC-EAD utilizado nos experimentos de eletroantenografia (imagem pessoal).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO [Associação Brasileira das Indústrias de Milho], 2022. **Estatísticas de Milho, Produção 2020/21**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>>. Acesso em: 29 jan 2022.

Albuquerque JRT, Lins HA, Santos MG, Freitas MAM, Oliveira FS, Souza ARE, Silveira LM, Nunes GHS, Júnior APB, Vieira PFMJ. Adaptability and stability of soybean (*Glycine max* L.) genotypes in semiarid conditions. **Euphytica**, v. 218, n. 61, p. 1-12, 2022.

Almeida MMTB. **Fertilizantes de Leguminosas: Autossuficiência de Nitrogênio em Sistemas Orgânicos de Produção**. 2012. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Asfaw MM & Abebe FB. Traditional medicinal plant species belonging to Fabaceae family in Ethiopia: A systematic review. **International Journal of Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2021.

Bergström G. Chemical ecology = chemistry + ecology! **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 2305-2323, 2007.

Berriél V, Monza J, Perdomo CH. Cover crop selection by jointly optimizing biomass productivity, biological nitrogen fixation, and transpiration efficiency: application to two *Crotalaria* species. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1-12, 2020.

Blassioli-Moraes MC, Laumann RA, Paula DP, Pareja M, Silva CCA, Vieira HG, Naime JM, Borges M. **Eletroantenografia: a antena do inseto como um biossensor**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos n. 270, 2008. 22 p.

Boulogne I, Petit P, Ozier-Lafontaine H, Desfontaines L, Loranger-Merciris G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, 2012.

Bouwmeester H, Schuurink RC, Bleeker PM, Schiestl F. The role of volatiles in plant communication. **The Plant Journal**, v. 100, n. 5, p. 892-907, 2019.

Borges M, Moraes MCB, Peixoto MF, Pires CSS, Sujii ER, Laumann RA. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 1-2, p. 68-80, 2011.

Borges M & Blassioli-Moraes MC. The semiochemistry of Pentatomidae. In: Cokl A & Borges M. (Org.). **Stink bugs: biorational control based on communication processes**. Boca Raton: CRC Press, 2017. Chapter 5.

Brezolin AN, Martinazzo J, Muenchen DK, de Cezaro AM, Rigo AA, Steffens C, Steffens J, Blassioli-Moraes MC, Borges M. Tools for detecting insect semiochemicals: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 17, p. 4091-4108, 2018.

- Burtet LM, Bernardi O, Melo AA, Pes MP, Strahl TT, Guedes JVC. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2569-2577, 2017.
- Carneiro FF, Augusto LGS, Rigotto RM, Friedrich K, Búrigo AC. Dossiê ABRASCO: **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.
- Chen W, Li Y, Wang M, Mao J, Zhang L. Evaluating the Potential of Using *Spodoptera litura* Eggs for Mass-Rearing *Telenomus remus*, a Promising Egg Parasitoid of *Spodoptera frugiperda*. **Insects**, v. 12, n. 5, p. 1-12, 2021.
- Christianson DW. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 17, p. 11570-11648, 2017.
- Christophe S, Jean-Christophe A, Annabelle L, Alain O, Marion P, Anne-Sophie V. Plant N Fluxes and Modulation by Nitrogen, Heat and Water Stresses: A Review Based on Comparison of Legumes and Non Legume Plants. In: Shanker AK & Venkateswarlu B. (Ed). **Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations**. Croatia: InTech, 2011. p. 79-118.
- Collins CH, Braga GL, Bonato P. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª Ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.
- CONAB [Companhia Nacional de Abastecimento], 2021. **Quadro de Oferta e Demanda de Grãos – dezembro/2021**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/oferta-e-demanda-de-graos>>. Acesso em: 29 jan 2022.
- Cook SM, Khan ZR, Pickett JA. The use of ‘push–pull’ strategies in integrated pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 375-400, 2007.
- Coppola M, Cascone P, Bossi S, Corrado G, Garonna AP, Maffei M, Rao R, Guerrieri E. *TPS* genes silencing alters constitutive indirect and direct defense in tomato. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2748, p. 1-19, 2018.
- Cork A, Beever PS, Gough AJE, Hall DR. Gas chromatography linked to electroantennography: a versatile technique for identifying insect semiochemicals. In: McCaffery AR & Wilson ID. (Ed.). **Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones**. New York: Springer, 1990. p. 271-279.
- Couillaud J, Duquesne K, Iacazio G. Extension of the Terpene Chemical Space: The Very First Biosynthetic Steps. **ChemBioChem**, v. 23, n. 9, p. 1-14, 2021.
- De Bruyne M & Baker TC. Odor detection in insects: volatile codes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 7, p. 882-897, 2008.
- Dewick PM. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3<sup>rd</sup> Ed. John Wiley & Sons, 2009.

Dias AS, Marucci RC, Mendes SM, Moreira SG, Araujo OG, Santos CA, Barbosa TA. Bioecology of *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1757) in different cover crops. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, p. 337-345, 2016.

Dicke M & Baldwin IT. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 3, p. 167-175, 2010.

Du Plessis H, Schlemmer ML, Van den Berg J. The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 11, n. 4, p. 228, 2020.

Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 16-32, 2013.

Dyer LA, Philbin CS, Ochsenrider KM, Richards LA, Massad TJ, Smilanich AM, Forister ML, Parchman TL, Galland LM, Hurtado PJ, Espeset AE, Glassmire AE, Harrison JG, Mo C, Yoon S, Pardikes NA, Muchoney ND, Jahner JP, Slinn HL, Shelef O, Dodson CD, Kato MJ, Yamaguchi LF, Jeffrey CS. Modern approaches to study plant-insect interactions in chemical ecology. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 50-64, 2018.

Elgar MA, Zhang D, Wang Q, Wittwer B, Pham H. Insect antennal morphology: evolution of diverse solutions to a similar problem. **Yale Journal of Medicine and Biology**, v. 91, p. 457-469, 2018.

El-Shafie HAF & Faleiro JR. Semiochemicals and their Potential Use in Pest Management. In: Shields V. (Ed.). **Biological Control of Pest and Vector Insects**. London: IntechOpen, UK, 2017. p. 3-22.

Embrapa. **Adubação Verde com Leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 49 p.

Embrapa. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, 2018a. 212 p.

Embrapa. **Trajatória da Agricultura Brasileira**. 2018b Disponível em: <<https://www.embrapa.br/visao/trajetoria-da-agricultura-brasileira>>. Acesso em: 2 mar 2022.

Embrapa. **Embrapa em números**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. 140 p.

Erb M & Kliebenstein DJ. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39-52, 2020.

Espindola JAA, Almeida DL, Guerra JGM. **Estratégias para utilização de leguminosas para adubação verde em unidades de produção agroecológica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 24 p.

Faria M, Souza DA, Sanches MM, Schmidt FGV, Oliveira CM, Benito NP, Lopes RB. Evaluation of key parameters for developing a *Metarhizium rileyi*-based biopesticide

- against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize: laboratory, greenhouse, and field trials. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 1146-1154, 2021.
- Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150-158, 2014.
- Faylo JL, Ronnebaum TA, Christianson DW. Assembly-line catalysis in bifunctional terpene synthases. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 20, p. 3780-3791, 2021.
- Flores AS, Azevedo Tozzi AMG, Trigo JR. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 459-469, 2009.
- Fortune Business Insights. **Semiochemicals Market Size, Share & Covid-19 Impact Analysis**, By Type (Pheromones and Allelochemicals), By Function (Mass Trapping, Detection & Monitoring, and Mating Disruption), Crop Type (Field Crops, Orchard Crops, Vegetable Crops, and Others), and Regional Forecast, 2021-2028. 2021. Disponível em: <<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/semiochemicals-market-101617>>. Acesso em: 28 fev 2022.
- Frank A & Groll M. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 8, p. 5675-5703, 2017.
- Gaffke AM, Alborn HT, Dudley TL, Bean DW. Using chemical ecology to enhance weed biological control. **Insects**, v. 12, n. 695, p. 1-16, 2021.
- Galeano ESJ, Costa CM, Orrico-Junior MAP, Fernandes T, Retore M, Silva MSJ, Orrico ACA, Lopes LS, Garcia RA, Machado LAZ. Agronomic aspects, chemical composition and digestibility of forage from corn-crotalaria intercropping. **The Journal of Agricultural Science**, v. 159, p. 580-588, 2021.
- Garcia MVC, Nogueira MA, Hungria M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. **AMB Express**, v. 11, n. 71, p. 1-13, 2021.
- Guan F, Zhang J, Shen H, Wang X, Padovan A, Walsh TK, Tay WT, Gordon KHJ, James W, Czapak C, Otim MH, Kachigamba D, Wu Y. Whole-genome sequencing to detect mutations associated with resistance to insecticides and Bt proteins in *Spodoptera frugiperda*. **Insect Science**, v. 28, n. 3, p. 627-638, 2021.
- Gullan PJ & Cranston PS. **Insetos: fundamentos da entomologia**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.
- Gonzalez MH, Bianchi SR, Pereira CD, Cassiano NM, Cass QB. Detector evaporativo com espalhamento de luz: princípios de operação e aplicações em cromatografia líquida de alta eficiência. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 4, p. 315-325, 2011.
- Han D, Ryu JY, Lee H, Hur HG. Bacterial biotransformation of phenylpropanoid compounds for producing flavor and fragrance compounds. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 125-133, 2013.



- He Y, Zhu L, Ma J, Lin G. Metabolism-mediated cytotoxicity and genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 1917-1942, 2021.
- Hernández-Suárez EM & Beitia F. Sustainable Management Methods of Orchard Insect Pests. **Insects**, v. 12, n. 80, p. 1-2, 2021.
- Hoffman BM, Lukoyanov D, Yang ZY, Dean DR, Seefeldt LC. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041-4062, 2014.
- Holler FJ, Skoog DA, Crouch SR. **Princípios de análise instrumental**. 6ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- Inomoto MM. Manejo cultural de nematoides. In: Galbieri, R. e Belot, J. L. (Ed.). **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiabá: IMAmt, 2016. p. 257-286.
- Jha UC, Nayyar H, Parida SK, Bakır M, von Wettberg EJ, Siddique KHM. Progress of Genomics-Driven Approaches for Sustaining Underutilized Legume Crops in the Post-Genomic Era. **Frontiers in Genetics**, v. 13, n. 831656, p. 1-24, 2022.
- Kantsa A, Raguso RA, Lekkas T, Kalantzi OI, Petanidou T. Floral volatiles and visitors: A meta-network of associations in a natural community. **Journal of Ecology**, v. 107, n. 6, p. 2574-2586, 2019.
- Khan Z, Amudavi D, Pickett J. **Push-pull technology transforms small farms in Kenya**. 2008. Disponível em: <<http://www.push-pull.net/panna.pdf>>. Acesso em: 13 mar 2022.
- Khan ZR, Midega CA, Bruce TJ, Hooper AM, Pickett JA. Exploiting phytochemicals for developing a ‘push–pull’ crop protection strategy for cereal farmers in Africa. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4185-4196, 2010.
- Khare E & Yadav A. The role of microbial enzyme systems in plant growth promotion. **Climate Change and Environmental Sustainability**, v. 5, n. 2, p. 122-145, 2017.
- Kong CH, Xuan TD, Khanh TD, Tran HD, Trung NT. Allelochemicals and Signaling Chemicals in Plants. **Molecules**, v. 24, n. 2737, p. 1-19, 2019.
- Kuhlisch C & Pohnert G. Metabolomics in chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 937-955, 2015.
- Kushida A, Suwa N, Ueda Y, Momota Y. Effects of *Crotalaria juncea* and *C. spectabilis* on hatching and population density of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (Tylenchida: Heteroderidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 38, n. 3, p. 393-399, 2003.
- Leal WS, Chen AM, Ishida Y, Chiang VP, Erickson ML, Morgan TI, Tsuruda JM. Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 15, p. 5386-5391, 2005.

- Lima AF, Ribeiro LP, Gonçalves GLP, Maimone NM, Gissi DS, Lira SP, Vendramim JD. Searching for bioactive compounds from Solanaceae: lethal and sublethal toxicity to *Spodoptera frugiperda* and untargeted metabolomics approaches. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 3, p. 1-13, 2021.
- Lin J, Massonnet M, Cantu D. The genetic basis of grape and wine aroma. **Horticulture Research**, v. 6, n. 81, p. 1-24, 2019.
- López-Ráez JA, Flors V, García JM, Pozo MJ. AM symbiosis alters phenolic acid content in tomato roots. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 9, p. 1138-1140, 2010.
- Ma J, Xia Q, Fu PP, Lin G. Pyrrole-protein adducts - A biomarker of pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 965-972, 2018.
- MAPA [Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento]. **Agropecuária encerra 2021 com VBP de R\$ 1,129 trilhão** (Soja, Milho, Carnes Bovina e de Frango lideram crescimento). Nota Técnica nº 03 - 2022/CGPLAC/DAEP/SPA/MAPA. Brasília, DF. 2022.
- Magalhães DM, Michereff MFF, Hassemer MJ, Blassioli-Moraes MC, Borges M. Semioquímicos no controle de pragas. In: Fontes EMG & Valadares-Inglis MC. (Ed.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. p. 415-450.
- Matiello CPG. **Estudo comparado das sensilas nas antenas de abelhas**. 2008. 58 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- Mattocks AR. Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. **Nature**, v. 217, n. 5130, p. 723-728, 1968.
- McCormick AC, Unsicker SB, Gershenzon J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 5, p. 303-310, 2012.
- Mercante FM, Hungria M, Mendes IC, Reis-Júnior FB, Diva SA. Fixação biológica de nitrogênio em adubos verdes. In: Lima-Filho OF, Ambrosano EJ, Rossi F, Carlos JAD. (Ed.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática**. Brasília: Embrapa, 2014. p. 307-334.
- Michereff MFF, Grynberg P, Togawa RC, Costa MMC, Laumann RA, Zhou JJ, Schimmelpfeng PHC, Borges M, Pickett JA, Birkett MA, Blassioli-Moraes MC. Priming of indirect defence responses in maize is shown to be genotype-specific. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 15, n. 3, p. 313-328, 2021.
- Mondo AD, Sansone C, Brunet C. Insights into the biosynthesis pathway of phenolic compounds in microalgae. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 1901-1913, 2022.
- Moorhouse JE, Yeadon R, Beevor PS, Nesbitt BF. Method for use in studies of insect chemical communication. **Nature**, v. 223, n. 5211, p. 1174-1175, 1969.



Nabavi SM, Šamec D, Tomczyk M, Milella L, Russo D, Habtemariam S, Sutar I, Rastrelli L, Daglia M, Xiao J, Giampieri F, Battino M, Sobarzo-Sanchez E, Nabavi SF, Yousefi B, Jeandet P, Xu S, Shiroye S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, n. 107316, p. 1-12, 2020.

Nelson DL & Cox MM. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

Niassy S, Agbodzavu MK, Kimathi E, Mutune B, Abdel-Rahman EFM, Salifu D, Hailu G, Belayneh YT, Felege E, Tonnang HEZ, Ekesi S, Subramanian S. Bioecology of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), its management and potential patterns of seasonal spread in Africa. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6, p. 1-24, 2021.

Ober D & Kaltenecker E. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1687-1695, 2009.

Oliveira C, Orozco-Restrepo SM, Alves ACL, Pinto BS, Miranda MS, Barbosa MHP, Picanço MC, Pereira EJG. Seed treatment for managing fall armyworm as a defoliator and cutworm on maize: plant protection, residuality, and the insect life history. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 1240-1250, 2021.

Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizzas MR. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

Oliveira Neto SS, Pereira FFS, Zoz T, Oliveira CEDS, Cirino VM. Effect of water deficit on morphoagronomic traits of black common bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) with contrasting drought tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, p. 1-11, 2022.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2015.

Pacheco JS & Silva-López RES. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**, v. 5, n. 03, p. 43-52, 2010.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1-15, 2016.

Paredes-Sánchez FA, Rivera G, Bocanegra-García V, Martínez-Padrón HY, Berrones-Morales M, Niño-García N, Herrera-Mayorga V. Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. A Review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 1-19, 2021.

Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. **Introdução à espectroscopia**. 2ª Ed. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2016.

Pearse IS, LoPresti E, Schaeffer RN, Wetzel WC, Mooney KA, Ali JG, Ode PJ, Eubanks MD, Bronstein JL, Weber MG. Generalising indirect defence and resistance of plants. **Ecology Letters**, v. 23, n. 7, p. 1137-1152, 2020.

- Pérez-Gutiérrez S, Zavala-Sánchez MA, González-Chávez MM, Cárdenas-Ortega NC, Ramos-López MA. Bioactivity of *Carica papaya* (Caricaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7502-7509, 2011.
- Peteira B, González I, Arias Y, Fernández-Turro A, Miranda I, Martínez B. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Revista de Protección Vegetal**, v. 26, n. 1, p. 16-22, 2011.
- Pickett JA & Khan ZR. Plant volatile-mediated signalling and its application in agriculture: successes and challenges. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 856-870, 2016.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308-316, 2009.
- Pinto-Zevallos DM, Martins CB, Pellegrino AC, Zarbin PH. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.
- Prada F, Stashenko EE, Martínez JR. Volatiles Emission by *Crotalaria nitens* after Insect Attack. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 1-14, 2021.
- Prado M. Uso da Crotalária como fonte de adubo na reforma de pastagens. **Pasto com Ciência**, 2022. Disponível em: <<https://pastocomciencia.com.br/2022/04/06/uso-da-crotalaria-como-fonte-de-adubo-na-reforma-de-pastagens/>>. Acesso em: 08 jul 2022.
- Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913-920, 2010.
- Renou M. Pheromones and General Odor Perception in Insects. In: Mucignat-Caretta C (Ed.). **Neurobiology of Chemical Communication**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014. Chapter 2.
- Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic Compounds. In: Yahia E & Carrillo-Lopez A. (Ed). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019. p. 253-271.
- Rosado MC, Araújo GJ, Pallini A, Venzon M. Cover crop intercropping increases biological control in coffee crops. **Biological Control**, v. 160, n. 104675, p. 1-10, 2021.
- Saha T & Chandran N. Chemical ecology and pest management: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 6, p. 618-21, 2017.
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019.
- Schneider D. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. **Zeitschrift für vergleichende Physiologie**, v. 40, n. 1, p. 8-41, 1957.

- Schramm S, Köhler N, Rozhon W. Pyrrolizidine alkaloids: biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. **Molecules**, v. 24, n. 498, p. 1-44, 2019.
- Scupinari T, Russo HM, Ferrari ABS, Bolzani VS, Dias WP, Nunes EO, Hoffmann-Campo CB, Zeraik ML. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 747-755, 2020.
- Sharma A, Sandhi RK, Reddy GVP. A Review of Interactions between Insect Biological Control Agents and Semiochemicals. **Insects**, v. 10, n. 439, p. 1-16, 2019.
- Shiota Y & Sakurai T. Silencing of OBP genes: Generation of loss-of-function mutants of PBP by genome editing. In: Pelosi P & Knoll W. (Ed). **Methods in Enzymology**, v. 642. Academic Press, 2020. p. 325-344.
- Silva CGAD & Collins CH. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.
- Silva JS, Oliveira DP, Rufini M, Silva-Junior CL, Baptista MVBD, Silva LC, Aragão OOS, Pereira TA, Moreira FMS. New strains of *Bradyrhizobium* enrich plant biomass nitrogen content in *Crotalaria* for use as a green manure. **Bragantia**, v. 80, p. 1-12, 2021.
- Silva MD, Oliveira MGA, Lanna AC, Pires CV, Piovesan ND, José IC, Batista RB, Barros EG, Moreira MA. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 316-328, 2001.
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, Bryce DL. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.
- Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. **Fundamentos de Química Analítica**. 9ª Ed. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2015.
- Sobhy IS, Tamiru A, Chiriboga Morales X, Nyagol D, Cheruiyot D, Chidawanyika F, Subramanian S, Midega CAO, Bruce TJA, Khan ZR. Bioactive volatiles from Push-Pull companion crops repel fall armyworm and attract its parasitoids. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, n. 883020, p. 1-16, 2022.
- Souza RT, Valadão FCA, Júnior DDV, Guimarães PR, Paula VRR. Maize-crotalaria intercropping systems. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 1455-1468, 2019.
- Sprent JI, Ardley J, James EK. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017.
- Sudanich S, Tiaworanant S, Yenjai C. Cytotoxicity of flavonoids and isoflavonoids from *Crotalaria bracteata*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 22, p. 2641-2646, 2017.
- Sun X, Hu C, Jia H, Wu Q, Shen X, Zhao S, Jiang Y, Wu K. Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 3, p. 664-672, 2021.
- Taiz L & Zeiger E. **Plant Physiology**. 3<sup>rd</sup> Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

Tavares WS, Cruz I, Silva RB, Figueiredo MLC, Ramalho FS, Serrão JE, Zanuncio JC. Soil organisms associated to the weed suppressant *Crotalaria juncea* (Fabaceae) and its importance as a refuge for natural enemies. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 473-479, 2011.

Thoden TC & Boppré M. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2010.

Toscano LC, Calado-Filho GC, Cardoso AM, Maruyama WI, Tomquelski GV. Impacto de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho safrinha cultivado em Cassilândia e Chapadão do Sul, MS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 223-231, 2012.

Truzi CC, Vieira NF, Souza JM, Bortoli SA. Artificial Diets With Different Protein Levels for Rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 4, p. 1-7, 2021.

Tungmunnithum D, Drouet S, Lorenzo JM, Hano C. Characterization of Bioactive Phenolics and Antioxidant Capacity of Edible Bean Extracts of 50 Fabaceae Populations Grown in Thailand. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 1-19, 2021.

Turlings TCJ & Erb M. Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Mechanisms, ecological relevance, and application potential. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 433-452, 2018.

Valicente FH. *Bacillus thuringiensis*. In: Souza B, Vázquez LL, Marucci RC. (Ed.). **Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems: biological control and functional biodiversity**. Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 151-159.

Vargas CC, Redaelli LR, Sant'Ana J, Blassioli-Moraes MC, Laumann RA, Borges M. Influence of semiochemicals present in the scales of *Spodoptera frugiperda* on chemotactic behavior of *Trichogramma pretiosum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 169, n. 4, p. 393-402, 2021.

Vervoort N, Daemen D, Török G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p. 92-100, 2008.

Viana, G. Crotalaria reduz infestações da lagarta-do-cartucho no milho. **Agroecologia e produção orgânica - Manejo Integrado de Pragas**, Sete Lagoas-MG, 20 dez 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18919691/crotalaria-reduz-infestacoes-da-lagarta-do-cartucho-no-milho>. Acesso em: 31 maio 2022.

Vincenti S, Mariani M, Alberti JC, Jacopini S, Caraffa VBB, Berti L, Maury J. Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxygenase metabolic pathway. **Catalysts**, v. 9, n. 873, p. 1-35, 2019.

Wang KH, Sipes BS, Schmitt DP. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. **Nematropica**, v. 31, p. 237-251, 2001.

Wang KH, Sipes BS, Schmitt DP. Crotalaria as a cover crop for nematode management: A review. **Nematropica**, v. 32, p. 35-57, 2002.

Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 3, p. 282-292, 2011.

Zarbin PH, Ferreira JTB, Leal WS. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, p. 263-268, 1999.

Zeki OC, Eylem CC, Reçber T, Kır S, Nemutlu E. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 190, n. 113509, p. 1-17, 2020.

Zhang S, Kong X, Ze S, Wang H, Lin A, Liu F, Zhang Z. Discrimination of *cis-trans* sex pheromone components in two sympatric Lepidopteran species. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 73, p. 47-54, 2016.

Zhao L, Chang WC, Xiao Y, Liu HW, Liu P. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 497-530, 2013.

## CAPÍTULO 1

Influência dos compostos voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* e milho, na comunicação química com *Spodoptera frugiperda*.

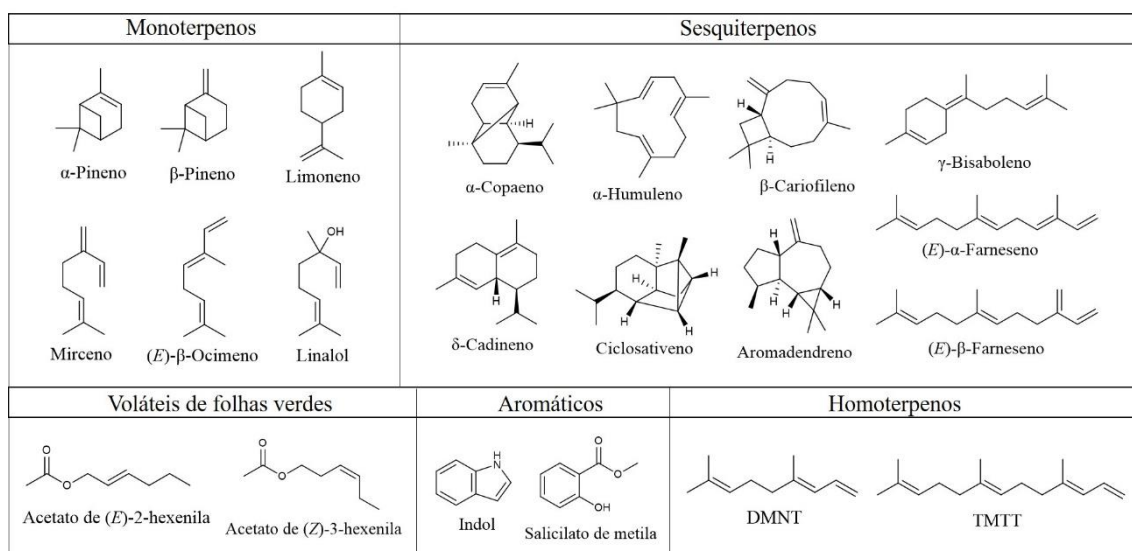
### 1. INTRODUÇÃO

As plantas emitem uma série de compostos orgânicos voláteis (COVs), que por definição são metabólitos secundários de baixo peso molecular, biossintetizados a partir das rotas do mevalonato, do fosfato de metileritritol e da lipoxigenase, e são consequência de sua interação com fatores bióticos e abióticos. Podem ser usados como sinais de comunicação química entre plantas e outros organismos, como nas interações planta-polinizador, planta-herbívoro e até mesmo interações planta-planta (Austin & Ballaré, 2014; Picazo-Aragonés et al., 2020).

No contexto das interações planta-planta e planta-herbívoro, após injúrias por herbívoros, as plantas, no geral, emitem COVs para se defenderem contra o invasor, que também podem atuar como um sinal de alerta para plantas vizinhas ou para partes não injuriadas da mesma planta, que ativam o seu sistema de defesa contra o agente estressor (Brosset & Blande, 2022). As chamadas plantas “inteligentes” foram adaptadas para responderem rapidamente aos compostos voláteis de defesa, em resposta às injúrias causadas por pragas, para o recrutamento de inimigos naturais (Michereff et al., 2019; Blassioli-Moraes et al., 2022).

A sinalização volátil de defesa induzida produzida por plantas de milho devido às injúrias causadas pela lagarta *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) pode variar com o genótipo de milho, e um genótipo específico, Sintético *Spodoptera*, responde de forma mais rápida e mais intensa (produz mais voláteis) que os outros cinco genótipos de milho avaliados por Michereff e colaboradores (2019). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que o milho é capaz de produzir uma variedade de COVs majoritários, como acetato de (*E*)-2-hexenila, acetato de (*Z*)-3-hexenila, linalol, DMNT, indol, ciclosativeno,  $\beta$ -cariofileno, (*E*)- $\beta$ -farneseno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno e TMTT (Figura 1), e que alguns desses compostos apresentaram aumento de emissão ao longo do tempo após injúria de *S. frugiperda*. Os COVs que são produzidos pelas plantas devido à injúria de um herbívoro e agem na defesa das plantas são chamados de voláteis de plantas induzidos por herbivoria (VPIHs).

O ataque de lagartas também pode aumentar significativamente a emissão de compostos voláteis nas folhas em comparação a quando são submetidas à injúria mecânica. Isto foi observado quando plantas de *Crotalaria nitens* Kunth (Fabales: Fabaceae) foram atacadas pela lagarta especialista *Utetheisa ornatrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae) e produziram diversos COVs majoritários como (*E*)- $\beta$ -ocimeno, DMNT, acetato de (*Z*)-3-hexenila,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, (*E*)- $\alpha$ -farneseno, salicilato de metila e indol (Figura 1), que não foram todos detectados quando a planta sofreu a injúria mecânica (Prada et al., 2021).



**Figura 1.** Estrutura química de alguns COVs emitidos por plantas.

A capacidade das plantas lidarem com as injúrias dos herbívoros é alcançada através do desenvolvimento de mecanismos de resistência (Dudareva et al., 2013). Estudos de campo anteriormente citados, mostraram que há um efeito negativo sobre a população de *S. frugiperda* em milho quando cultivado em consórcio com *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabales: Fabaceae) (Tavares et al., 2011; Dias et al., 2016; Viana, 2016; Blassioli-Moraes et al., dados não publicados). Os trabalhos sugerem que pode haver uma interação química envolvida entre herbívoros e *Crotalaria* sp., mas são necessárias pesquisas para entender as interações químicas e ecológicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a química dos COVs das plantas de *C. spectabilis* e de milho, que possam estar envolvidos na interação dessas duas plantas com a mariposa *S. frugiperda*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar por cromatografia gasosa e espectrometria de massas o perfil químico dos COVs emitidos por plantas de *C. spectabilis* e de milho, com e sem injúria de herbivoria de lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*;

- Avaliar se as plantas de *C. spectabilis* e de milho respondem à injúria de herbivoria mudando seu perfil químico de COVs;

- Comparar o perfil químico dos COVs emitidos pelas plantas de *C. spectabilis* e de milho nos períodos 0-24 e 24-48 h;

- Identificar quais COVs das plantas de *C. spectabilis* e de milho têm potencial de afetar a resposta comportamental da mariposa *S. frugiperda* através de análises eletrofisiológicas;

- Avaliar se a mariposa *S. frugiperda* é capaz de discriminar os COVs emitidos por plantas de *C. spectabilis* e de milho com injúria de herbivoria;

- Avaliar por meio de bioensaios comportamentais a taxa de oviposição das fêmeas de *S. frugiperda* nas plantas de *C. spectabilis* e de milho.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Local

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF, Brasil.

#### 3.2 Criação de *Spodoptera frugiperda*

Os insetos foram provenientes da Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF, mantidos em salas climatizadas sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $65 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 h. As lagartas foram obtidas de colônia de laboratório, mantidas em recipientes de plástico com dieta artificial a base de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabales: Fabaceae), segundo a metodologia descrita por Schmidt e colaboradores (2001). As lagartas utilizadas nos experimentos estavam no final do segundo instar, e sua dieta foi retirada 24 h antes da condução dos experimentos. As pupas foram separadas por sexo e as mariposas recém emergidas foram transferidas para gaiolas de plástico de 3000 mL, contendo um frasco de vidro de 10 mL com alimento (solução de 10% de mel em água).

#### 3.3 Cultivo de plantas

As sementes de crotalária (*C. spectabilis*) foram obtidas da Sementes Caiçara LTDA, sediada em Brejo Alegre - SP. As sementes de milho foram obtidas do banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas - MG, e pertencem ao genótipo Sintético *Spodoptera*, que possui resistência à *S. frugiperda*. As sementes de crotalária e de milho foram germinadas em papel úmido por dois dias.

A semeadura foi feita em vasos de plástico de 10 cm de altura, com diâmetro de 12 cm na parte superior e 9 cm na parte inferior, preenchidos com uma mistura de solo autoclavado e substrato orgânico (Maxfertil Substratos, Pouso Redondo - SC) na proporção de 1:1. Em cada vaso foram depositadas cinco sementes, e sete dias após a semeadura foi realizado um desbaste, deixando apenas três plantas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e as plantas foram irrigadas a cada dois dias.

Em todos os experimentos, as plantas de crotalária foram utilizadas com 40-45 dias após a germinação, e as plantas de milho foram utilizadas com 12-17 dias após a germinação. Nesses períodos, ambas estavam no estágio vegetativo e com alturas semelhantes.

Cada planta foi submetida a dois tratamentos: plantas saudas sem injúria de insetos (controle) e plantas submetidas à injúria de herbivoria de lagartas de *S. frugiperda* no final do segundo instar (tratamento). Para o tratamento, cada planta recebeu três lagartas.

### 3.4 Coleta de voláteis

A coleta de voláteis das plantas de crotalária e de milho foi conduzida usando a técnica de aeração. Afim de minimizar possíveis contaminações dos voláteis do solo, os vasos de plástico e suas superfícies foram revestidos com papel alumínio, e cada vaso contendo três plantas de crotalária ou de milho foi colocado dentro de câmaras de vidro individuais (volume interno de 10 L). No sistema de aeração (Figura 2), o ar entrava na parte inferior das câmaras impulsionado por meio de um compressor com corrente de ar de 1,0 L/min. O ar foi filtrado por um filtro de carvão ativado (20-40 *mesh*, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), permitindo somente a entrada de ar purificado na câmara. A saída do ar ocorreu através de uma bomba de vácuo com vazão de 0,6 L/min, conectada a um tubo de vidro (comprimento 10 cm, diâmetro interno 0,5 cm) contendo 100 mg do polímero adsorvente Porapak Q (50-80 *mesh*, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) na parte superior da câmara. As conexões da entrada de ar foram todas via tubos de politetrafluoretileno (PTFE). Os fluxos de ar de entrada e de saída da câmara foram ajustados de forma a criar um sistema de pressão positiva.

Os voláteis foram coletados e eluídos dos tubos adsorventes usando 500 µL do solvente orgânico hexano. Foram avaliados dois períodos de coleta de voláteis (0-24 e 24-48 h), visto que a lagarta se alimenta rapidamente do milho e este responde à injúria logo nas primeiras horas, enquanto para a crotalária poderia haver uma certa resistência por parte da lagarta em se alimentar nas primeiras horas, por não ser o seu hospedeiro preferencial. Foram feitas seis replicatas para controle e seis para tratamento.



**Figura 2.** Sistema de aeração utilizado para a coleta dos compostos orgânicos voláteis das plantas de **(a)** *Crotalaria spectabilis* e de **(b)** milho (genótipo Sintético Spodoptera), em que 1 representa o tubo de vidro contendo o polímero adsorvente Porapak Q (por onde é feita a saída do ar), e 2 representa o filtro de carvão ativado conectado ao tubo de teflon e entrando na parte inferior da câmara, por onde ocorre a entrada de ar purificado (imagens pessoais).

Entre cada coleta, o adsorvente foi limpo com 1,0 mL de hexano e reconicionado em um forno a 180 °C durante 1 hora, sob fluxo constante de nitrogênio. Cada amostra obtida foi armazenada a -20 °C até sua utilização para as análises químicas.

### 3.5 Análises químicas

As análises quantitativas dos COVs coletados das plantas com e sem injúria de herbivoria foram realizadas através do método do padrão interno (PI). Para isto, cada amostra foi acrescida de 1  $\mu\text{L}$  do PI tetracosano 0,25 mg/mL, preparado em hexano destilado. Posteriormente, as amostras foram concentradas para um volume final de 50  $\mu\text{L}$  sob fluxo de nitrogênio, e uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi injetada no

cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC ou GC-FID, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*) (Agilent 7890A, EUA).

O GC-FID estava equipado com uma coluna capilar apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25 µm; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). As amostras foram analisadas usando um programa com gradiente de temperatura, iniciando a 40 °C por 2 min, aumentando gradualmente 5 °C/min até atingir 180 °C, seguido de um segundo gradiente de 10 °C/min até atingir 280 °C, que foi mantido por 15 min. Temperatura do injetor a 250 °C, e do detector a 270 °C, usando o modo *splitless* e tendo o hélio como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min. A quantificação dos compostos liberados pelas plantas foi realizada através da comparação das áreas de cada composto com a área do PI utilizado, considerando-se o fator de resposta do detector para todos os compostos igual a 1,0. Os dados foram coletados e analisados com o *software* GC OpenLab CDS ChemStation (Agilent, EUA) e tabulados com o programa Excel (Microsoft Office 2019, Microsoft Corporation, EUA).

Para as análises qualitativas, uma alíquota de 1 µL de amostras previamente selecionadas foi injetada no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM ou GC-MS, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*) (Agilent 5975 MSD, China), equipado com um analisador quadrupolar e coluna capilar apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25 µm; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), fonte de ionização por impacto de elétrons (70 eV, à temperatura de 200 °C), temperatura do injetor a 250 °C, usando o modo *splitless* e interface a 280 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. O mesmo programa de temperatura descrito anteriormente foi utilizado. Os dados foram coletados e analisados com o *software* MassHunter Workstation 10.1.49 (Agilent, EUA).

A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do padrão de fragmentação dos compostos da amostra com os dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST, 2020), e também pelo cálculo do índice de retenção (IR). Para o cálculo do IR, uma mistura de padrões de *n*-alcanos lineares (C<sub>8</sub>-C<sub>26</sub>) de concentração 0,03 mg/mL foi injetada nas mesmas condições anteriormente descritas, para comparação de resultados com dados da literatura, podendo ser calculado através da equação (1):

$$IR = 100 \times \left[ n + (N - n) \frac{t'_r(\text{composto}) - t'_r(n)}{t'_r(N) - t'_r(n)} \right], \quad (1)$$

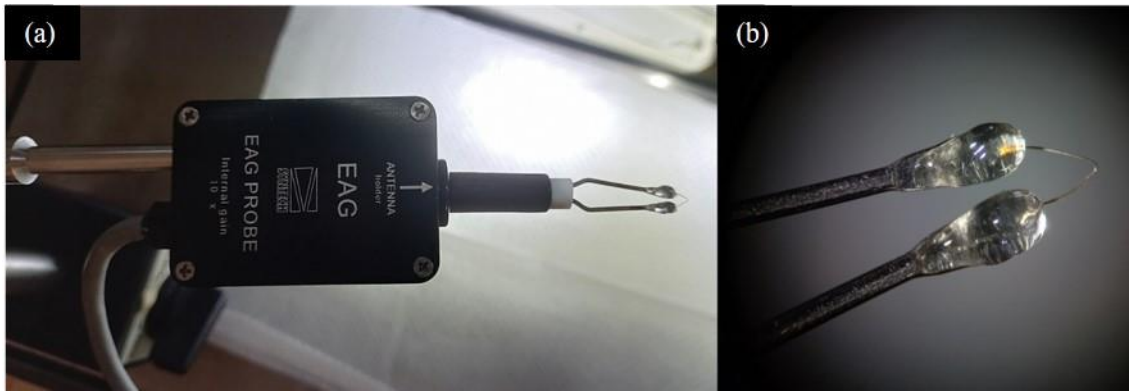
em que  $IR$  = Índice de Retenção,  $n$  = o número de átomos de carbono do  $n$ -alcano de menor cadeia,  $N$  = o número de átomos de carbono do  $n$ -alcano de maior cadeia,  $t'_{r(\text{composto})}$  = tempo de retenção do composto a ser identificado,  $t'_{r(n)}$  = tempo de retenção do composto com o menor número de átomos de carbono,  $t'_{r(N)}$  = tempo de retenção do composto com o maior número de átomos de carbono.

Para confirmação final da identificação dos compostos, foram injetados os padrões sintéticos disponíveis na concentração de 0,01 mg/mL.

### 3.6 Análises eletrofisiológicas

Para verificar para quais COVs dos extratos de herbivoria as antenas de fêmeas e de machos de *S. frugiperda* possuíam receptores, foram realizadas análises de cromatografia gasosa acoplada ao detector de eletroantenografia (CG-DEA ou GC-EAD, do inglês *gas chromatography coupled to electroantennographic detector*). As antenas de machos e de fêmeas, virgens e acasalados, foram cortadas e posicionadas em um eletrodo de aço inoxidável, contendo gel condutor de corrente elétrica (Mercur, Brasil), conforme mostrado na Figura 3. Uma alíquota de 2  $\mu$ L de amostras previamente selecionadas de extratos com injúria de herbivoria de lagartas de *S. frugiperda* em crotalária e em milho foi injetada em um cromatógrafo gasoso (Perkin Elmer Clarus 680) equipado com coluna capilar apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25  $\mu$ m; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), detector de ionização de chama (FID), e acoplado ao detector de eletroantenografia (EAD).

Para análise dos extratos, foi usado um programa com rampa de temperatura, iniciando a 40 °C por 1 min, aumentando gradualmente 8 °C/min até atingir 250 °C, e mantendo por 5 min. Temperatura do injetor a 250 °C, e do detector a 270 °C, usando o modo *splitless* e tendo o hélio como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min. No GC-EAD o fluxo da coluna foi dividido, de forma que metade do volume injetado foi direcionado para o detector FID e a outra metade foi para a antena do inseto junto ao detector EAD. A interface do GC com o detector EAD foi mantida a 250 °C. As respostas das antenas foram medidas em despolarizações (mV), os sinais das respostas das antenas foram amplificados por um amplificador de alta impedância (UN-06, Syntech, Holanda), e os registros simultâneos das respostas do EAD e do FID foram analisados utilizando o *software* GcEad v1.2.5 2014 (Syntech, Alemanha). Foram realizadas seis repetições para cada sexo e condição (virgem ou acasalado) e cada antena foi utilizada apenas uma vez.



**Figura 3.** Sistema empregado para as análises eletrofisiológicas. (a) eletrodo de aço inoxidável; (b) extremidades da antena de *Spodoptera frugiperda* posicionadas no eletrodo de aço inoxidável, contendo gel condutor de corrente elétrica (imagens pessoais).

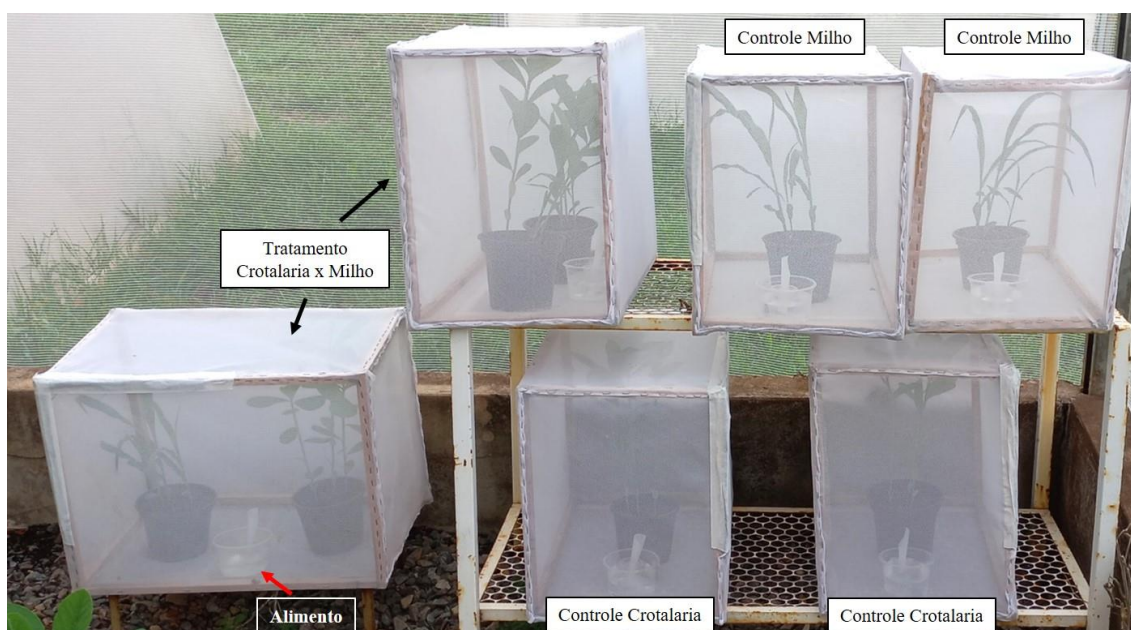
Após a identificação dos compostos com atividade eletrofisiológica no GC-EAD, foi testada a resposta dos padrões sintéticos puros por eletroantenografia (EAG). O sistema que direcionava os estímulos odoríferos à antena consistia em uma pipeta Pasteur de vidro com um pedaço de papel filtro (2 x 2 cm) em seu interior, que estava impregnado com 10  $\mu$ L das soluções dos padrões sintéticos na concentração de 1,0 mg/mL (em hexano destilado). Um fluxo de 1,0 L/min de ar filtrado e umidificado passava pela pipeta levando os voláteis à antena. O estímulo de cada composto foi feito em triplicata, e entre cada triplicata de composto, foi feita uma triplicata de hexano para ter o sinal do branco. Então, foi feita a média das respostas para a mesma antena, seguida da média entre as replicatas das diferentes antenas. Foram testadas doze antenas de cada sexo virgens e cinco antenas de cada sexo acasaladas (o número inferior de antenas utilizadas para os insetos acasalados foi devido ao fato de as respostas serem similares às antenas dos insetos virgens) e cada antena foi utilizada apenas uma vez. As respostas das antenas foram normalizadas em relação ao sinal do hexano e foram gravadas utilizando o *software* GcEad v1.2.5 2014 (Syntech, Alemanha).

### 3.7 Bioensaio de oviposição em gaiolas

Para avaliar a preferência de oviposição de mariposas fêmeas de *S. frugiperda* nas plantas de crotalária e de milho ao longo de sete dias, foi montado um experimento sem chance e com chance de escolha entre as plantas. Para isso, foram montadas três gaiolas de madeira (40 cm de altura x 50 cm de largura x 30 cm de profundidade) cobertas por tecido tule. Duas destas gaiolas receberam um vaso com três plantas de crotalária ou três plantas de milho (experimento sem chance de escolha), e a terceira gaiola recebeu



vasos com três plantas de crotalária e três plantas de milho (experimento com chance de escolha), sendo que os vasos foram posicionados em cada extremidade da gaiola, conforme mostrado na Figura 4. Dentro de cada gaiola, foi colocado um frasco de vidro de 10 mL com alimento (solução de 10% de mel em água), uma fêmea e dois machos de *S. frugiperda*, com um dia na fase adulta. Após os insetos serem colocados nas gaiolas, as gaiolas e as plantas foram inspecionadas a cada 24 h, e a quantidade total de posturas (massa de ovos depositados) das mariposas nas plantas de crotalária e de milho foram contabilizadas. Após a contagem, as plantas com posturas eram trocadas por plantas saudas. O experimento foi acompanhado durante sete dias, e repetido sete vezes.



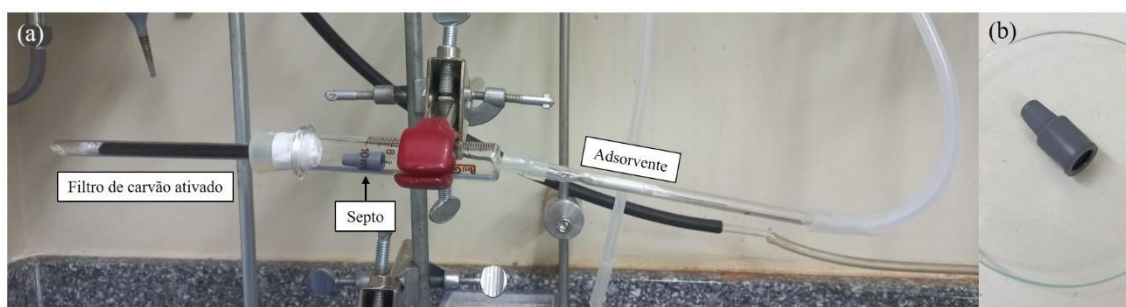
**Figura 4.** Gaiolas de madeira utilizadas no bioensaio de oviposição de mariposas de *Spodoptera frugiperda*, sem e com chance de escolha, em *Crotalaria spectabilis* e em milho (genótipo Sintético *Spodoptera*) (imagem pessoal).

### 3.8 Preparo dos septos utilizados nos bioensaios em túnel de vento

Para a realização dos bioensaios no túnel de vento (metodologia 3.9), foram utilizados septos de borracha (Figura 5b) impregnados com soluções sintéticas contendo os voláteis de milho e de crotalária que foram eletrofisiologicamente ativos nos estudos de EAD. Em cada septo foi colocado 300  $\mu$ L dessa solução preparada em hexano destilado. A quantidade impregnada nos septos correspondia ao que a planta emite em 1 h, com os compostos na mesma proporção que a planta libera, sendo que o composto majoritário foi ajustado a 1 mg/mL, de forma que a concentração dos outros compostos foi calculada proporcionalmente. Após a adição dos 300  $\mu$ L em cada septo, estes foram

deixados *overnight* na capela, em temperatura ambiente, até toda a absorção da solução, antes de serem montadas as aerações.

Para determinar a proporção e quantidade liberada dos compostos ao longo de 30 dias, foram conduzidas aerações dos septos usando seringas de vidro de 10 mL e um sistema dinâmico de captura de voláteis (aeração). No sistema de aeração (Figura 5a), o ar entrava purificado por um filtro de carvão ativado (20-40 *mesh*, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), e a saída do ar ocorria através de uma bomba de vácuo com vazão de 0,6 L/min, conectada a um tubo de vidro (comprimento 10 cm, diâmetro interno 0,5 cm) contendo 100 mg do polímero adsorvente Porapak Q (50-80 *mesh*, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) na parte lateral da seringa. As conexões foram todas via tubos de politetrafluoretileno (PTFE). Os compostos foram coletados e eluídos dos tubos adsorventes usando 500  $\mu$ L do solvente orgânico hexano. Foram feitas três replicatas sendo que em cada seringa foi colocado um septo.



**Figura 5.** (a) Sistema de aeração utilizado para a coleta dos compostos orgânicos voláteis impregnados no (b) septo de borracha (imagens pessoais).

Para as análises quantitativas dos compostos, as amostras foram concentradas para um volume final de 300  $\mu$ L sob fluxo de nitrogênio, e uma alíquota de 1  $\mu$ L de cada amostra foi injetada GC-FID, que estava equipado nas mesmas condições da metodologia descrita em 3.5, com exceção do método utilizado, na qual as amostras foram analisadas através de um programa com gradiente de temperatura, iniciando a 40 °C por 2 min, aumentando gradualmente 15 °C/min até atingir 250 °C, que foi mantido por 10 min. A quantificação dos compostos foi realizada através de curvas de calibração dos compostos, com concentrações variando entre 0,07 e 0,001 mg/mL, e em seguida, foi feita uma média entre as três replicatas, para cada composto. Os dados foram coletados e analisados com o *software* GC OpenLab CDS ChemStation (Agilent, EUA) e tabulados com o programa Excel (Microsoft Office 2019, Microsoft Corporation, EUA).

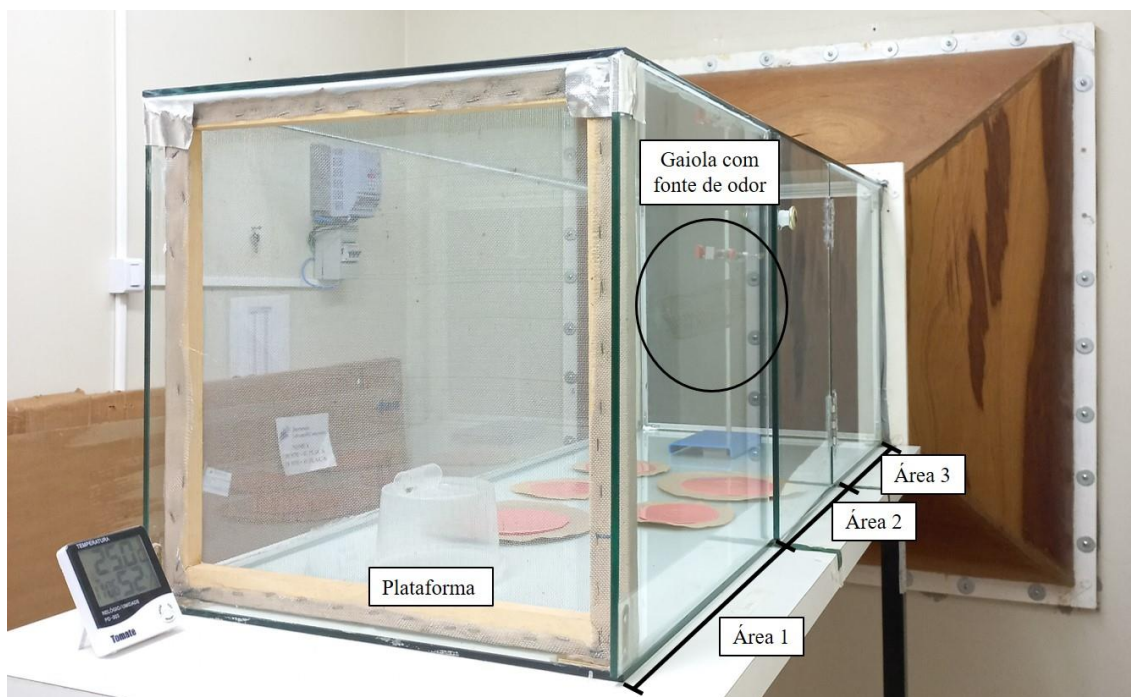


### 3.9 Bioensaios em túnel de vento

Foram conduzidos bioensaios em túnel de vento para avaliar se as mariposas de *S. frugiperda* eram capazes de discriminar os COVs emitidos por plantas de crotalária e de milho com injúria de herbivoria. O túnel de vento consiste em um vidro retangular (50 cm de altura x 150 cm de largura x 50 cm de profundidade) dividido igualmente em três áreas (Figura 6). O fluxo de ar dentro do túnel de vento foi estabelecido em 0,43 m/s. Na área 1, onde ocorria a liberação dos insetos, foi colocada uma plataforma aonde eram colocadas as mariposas, enquanto na área 3, uma gaiola de malha metálica foi pendurada em um suporte a 15 cm acima do piso do túnel de vento, com o septo de um dos tratamentos em seu interior. Todas as mariposas testadas (fêmeas e machos, virgens e acasalados) foram mantidas no ciclo biológico normal e estavam com idade entre 24 a 72 h após a emergência.

As respostas comportamentais monitoradas das mariposas foram: repouso (sem resposta), colocar antenas em V, batimento de asas, andar na plataforma, chegar nas áreas 1, 2 ou 3, pousar na fonte de odor ou próximo a ela. Com isso, foram realizados dois tratamentos: o primeiro consistiu em avaliar as respostas comportamentais das mariposas em relação ao septo contendo os compostos voláteis do milho que tiveram resposta eletrofisiológica, e o segundo consistiu em avaliar as mesmas respostas comportamentais das mariposas em relação ao septo contendo os compostos voláteis da crotalária que tiveram resposta eletrofisiológica. E para cada tratamento, foi feito o controle para avaliar as mesmas respostas comportamentais das mariposas em relação ao ar. Os septos foram utilizados nos bioensaios a partir de 10 dias após a preparação, quando a liberação dos compostos se tornava mais constante.

Todos os bioensaios foram conduzidos em temperaturas entre 16,7 e 27,8 °C, umidade relativa entre 25 e 61%, e períodos entre 7 e 11 h da manhã. Para cada tratamento, foram realizadas 30 repetições com duração de 10 minutos em cada observação, e todas as mariposas foram utilizadas apenas uma vez.



**Figura 6.** Túnel de vento utilizado nos bioensaios, dividido em três áreas (imagem pessoal).

### 3.10 Análises estatísticas

A quantidade total de COVs emitidos em cada tratamento foi analisada usando modelos lineares generalizados (MLG ou GLM, do inglês *generalized linear model*), com distribuição gama e função de ligação inversa, seguida pela análise de variância (Anova), através do *software* estatístico R (Foundation for Statistical Computing, versão 4.1.1) usando o pacote *carData*. Para determinar a contribuição de cada composto no perfil de separação entre controle e tratamento, foram realizadas análises multivariadas de componentes principais (ACP ou PCA, do inglês *principal component analysis*), usando a matriz de variância-covariância. Esta análise fornece uma representação gráfica dos compostos que mais contribuem para os níveis de agrupamento dos tratamentos. A PCA foi realizada utilizando o *software* Past (Paleontological Statistics, versão 4.04) (Hammer et al., 2001).

As respostas eletrofisiológicas das antenas de machos e de fêmeas aos voláteis sintéticos da planta foram comparadas em relação ao hexano (controle), e foram analisadas usando teste-*t* uni-caudal, através do programa Excel (Microsoft Office 2019, Microsoft Corporation, EUA).

A resposta de oviposição de fêmeas de *S. frugiperda* nas plantas de crotalária e de milho foi analisada usando GLM, com distribuição Poisson e função de ligação log,

seguida pela análise de variância (Anova), através do *software* estatístico R (Foundation for Statistical Computing, versão 4.1.1).

### 3.11 Origem dos compostos

Os compostos hexanal (98%), decanal (98%), undecanal (97%), canfeno (95%), (*E*)-3-hexen-1-ol (97%), acetato de (*Z*)-3-hexenila (98%),  $\alpha$ -pineno (98%),  $\beta$ -pineno (99%),  $\beta$ -mirceno (95%),  $\beta$ -ocimeno (mistura de isômeros, > 90%), benzotiazol (96%), limoneno (97%), benzaldeído (99%), indol (98,5%), salicilato de metila, 6-metil-5-hepten-2-ona (99%), 3-octanona (98%), 3-octanol (99%),  $\beta$ -cariofileno (98%), cariofileno óxido (99%), geranilacetona (97%), ciclosativeno (99%),  $\alpha$ -humuleno (96%), palmitato de metila (99%) e tetracosano (99%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). (*E*)-2-Hexenal (95%) e (*Z*)-3-hexen-1-ol (98%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido).  $\beta$ -Elemeno (98%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça).  $\beta$ -Farneseno (98%) foi fornecido por Shin-Etsu (Japão) e  $\alpha$ -farneseno foi obtido da Chemos GmbH&CoKG (Altdorf, Alemanha). Acetato de (*E*)-2-hexenila (97%) e linalol foram adquiridos da TCI-América (Portland, EUA). Os compostos 1-octen-3-ol, octanal, nonanal, 2-etilhexan-1-ol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -muroleno e  $\beta$ -bisaboleno foram doados pelo Dr. Jeffrey Aldrich (Agricultural Research Service – USDA). Os compostos (*E*)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno (DMNT) (95%) e (*E,E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) (97%) foram sintetizados por outros membros do grupo do laboratório, a partir do geraniol e (*E,E*)-farnesol, respectivamente, por oxidação de seus aldeídos correspondentes, seguida por metilenação de Wittig (Leopold, 1990). O composto  $\beta$ -sesquifelandreno foi purificado do óleo essencial de gengibre, e o composto  $\delta$ -cadineno foi purificado do óleo essencial cade organic, da Oshadhi (Bühl, Alemanha). O hexano (97%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e redestilado antes do uso.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análises químicas por cromatografia gasosa

A análise dos extratos de aeração contendo os voláteis das plantas permitiu a detecção de 39 compostos para a crotalária e 41 compostos para o milho (Tabelas 1 e 2). Comparando o perfil químico de voláteis obtido nas plantas sadias (controle) com as plantas submetidas à injúria de herbivoria da lagarta *S. frugiperda* (tratamento) (Figuras 7 e 8), foi possível observar diferenças qualitativas e quantitativas, tanto para a crotalária quanto para o milho. As plantas submetidas à herbivoria emitiram uma quantidade significativamente maior dos compostos (Figura 9).

Os COVs identificados foram encontrados em todas as replicatas, mesmo que em pequenas quantidades (traços), assim não houve diferenças qualitativas entre as replicatas dos mesmos tratamentos. Não houve diferença significativa com relação à quantidade total de COVs emitidos pela crotalária ao comparar os períodos 0-24 e 24-48 h para o controle ( $\chi^2 = 0,743$ ; gl = 1; p = 0,389) e para o tratamento ( $\chi^2 = 0,255$ ; gl = 1; p = 0,614). Houve diferença na quantidade total de COVs emitidos quando comparado as plantas sadias com as plantas submetidas à injúria de herbivoria, visto que estas liberaram uma quantidade significativamente maior de voláteis nos dois períodos avaliados 0-24 h ( $\chi^2 = 164,69$ ; gl = 1; p < 0,001) e 24-48 h ( $\chi^2 = 117,56$ ; gl = 1; p < 0,001) (Figura 9a). Os principais compostos que foram emitidos em maior quantidade pelas plantas com injúria de herbivoria foram os voláteis de folhas verdes (*E*) e (*Z*)-3-hexen-1-ol e acetato de (*Z*)-3-hexenila, o álcool 1-octen-3-ol e a cetona 3-octanona, os monoterpenos (*E*)- $\beta$ -ocimeno e linalol, e os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -farneseno.

**Tabela 1.** Quantidade média dos compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis*, emitidos por plantas sadias (controle) e plantas submetidas à injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*, coletados nos períodos 0-24 e 24-48 h (média  $\pm$  erro padrão, em ng/h).

N°	Composto	IR	Controle 0-24 h	Herbivoria 0-24h	Controle 24-48 h	Herbivoria 24-48 h
1	( <i>E</i> )-3-Hexen-1-ol	856	0.000 $\pm$ 0.000	6.834 $\pm$ 0.776	0.000 $\pm$ 0.000	9.281 $\pm$ 2.945
2	( <i>Z</i> )-3-Hexen-1-ol	858	0.000 $\pm$ 0.000	20.005 $\pm$ 2.837	0.000 $\pm$ 0.000	15.658 $\pm$ 2.375
3	$\alpha$ -Pinenos	935	0.968 $\pm$ 0.261	0.798 $\pm$ 0.246	1.239 $\pm$ 0.441	0.889 $\pm$ 0.336
4	Canfeno	951	Traços	Traços	Traços	Traços
5	$\beta$ -Pinenos	979	0.487 $\pm$ 0.125	0.332 $\pm$ 0.047	0.504 $\pm$ 0.167	0.379 $\pm$ 0.117
6	1-Octen-3-ol	981	0.000 $\pm$ 0.000	7.732 $\pm$ 1.274	0.000 $\pm$ 0.000	6.634 $\pm$ 0.728
7	6-Metil-5-hepten-2-ona	986	0.767 $\pm$ 0.200	0.000 $\pm$ 0.000	0.778 $\pm$ 0.259	0.000 $\pm$ 0.000
8	3-Octanona	986	0.000 $\pm$ 0.000	11.256 $\pm$ 2.604	0.000 $\pm$ 0.000	14.827 $\pm$ 2.947

9	$\beta$ -Miraceno	989	0.000 $\pm$ 0.000	1.995 $\pm$ 0.663	0.000 $\pm$ 0.000	2.130 $\pm$ 0.393
10	3-Octanol	996	0.000 $\pm$ 0.000	3.462 $\pm$ 0.565	0.000 $\pm$ 0.000	3.914 $\pm$ 0.422
11	Octanal	1003	1.119 $\pm$ 0.389	Traços	1.471 $\pm$ 0.547	Traços
12	Acetato de (Z)-3-hexenila	1004	0.000 $\pm$ 0.000	26.018 $\pm$ 6.480	0.000 $\pm$ 0.000	16.070 $\pm$ 2.424
13	2-Etilhexan-1-ol	1029	1.582 $\pm$ 0.302	1.450 $\pm$ 0.179	2.461 $\pm$ 1.064	1.302 $\pm$ 0.168
14	Limoneno	1030	0.925 $\pm$ 0.195	0.861 $\pm$ 0.185	0.908 $\pm$ 0.279	0.924 $\pm$ 0.233
15	N.I. *	1034	0.000 $\pm$ 0.000	0.703 $\pm$ 0.342	0.000 $\pm$ 0.000	0.773 $\pm$ 0.232
16	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1037	0.000 $\pm$ 0.000	1.008 $\pm$ 0.234	0.000 $\pm$ 0.000	1.235 $\pm$ 0.238
17	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1048	0.000 $\pm$ 0.000	31.545 $\pm$ 6.732	0.000 $\pm$ 0.000	37.211 $\pm$ 7.448
18	N.I.*	1075	3.508 $\pm$ 1.104	2.428 $\pm$ 1.189	6.234 $\pm$ 1.854	2.789 $\pm$ 0.940
19	Linalol	1099	0.000 $\pm$ 0.000	26.024 $\pm$ 5.185	0.000 $\pm$ 0.000	26.684 $\pm$ 3.256
20	Nonanal	1104	1.965 $\pm$ 0.514	2.197 $\pm$ 0.260	2.061 $\pm$ 0.860	1.601 $\pm$ 0.314
21	$\alpha$ -Terpineol	1196	Traços	Traços	Traços	Traços
22	Decanal	1206	2.253 $\pm$ 0.360	2.818 $\pm$ 0.320	2.170 $\pm$ 0.414	2.227 $\pm$ 0.380
23	Benzotiazol	1229	1.600 $\pm$ 0.168	1.566 $\pm$ 0.245	2.039 $\pm$ 0.198	1.865 $\pm$ 0.087
24	Indol	1292	0.000 $\pm$ 0.000	4.957 $\pm$ 0.902	0.000 $\pm$ 0.000	7.786 $\pm$ 2.235
25	Undecanal	1307	0.371 $\pm$ 0.055	0.324 $\pm$ 0.045	0.349 $\pm$ 0.070	0.333 $\pm$ 0.053
26	Éster N.I. *	1322	0.000 $\pm$ 0.000	2.906 $\pm$ 1.724	0.000 $\pm$ 0.000	3.316 $\pm$ 1.149
27	2-Aminobenzoato de metila *	1341	0.000 $\pm$ 0.000	1.111 $\pm$ 0.205	0.000 $\pm$ 0.000	1.752 $\pm$ 0.788
28	Éster N.I. *	1383	0.000 $\pm$ 0.000	3.565 $\pm$ 1.004	0.000 $\pm$ 0.000	4.930 $\pm$ 2.493
29	$\beta$ -Elemeno	1390	0.000 $\pm$ 0.000	0.389 $\pm$ 0.043	0.000 $\pm$ 0.000	0.675 $\pm$ 0.122
30	Dodecanal *	1406	0.000 $\pm$ 0.000	0.360 $\pm$ 0.040	0.000 $\pm$ 0.000	0.322 $\pm$ 0.033
31	$\beta$ -Cariofileno	1422	0.000 $\pm$ 0.000	5.034 $\pm$ 0.969	0.000 $\pm$ 0.000	7.621 $\pm$ 1.751
32	<i>trans</i> Geranilacetona	1448	0.915 $\pm$ 0.110	1.004 $\pm$ 0.071	0.761 $\pm$ 0.120	0.577 $\pm$ 0.103
33	Sesquiterpeno N.I. *	1482	0.000 $\pm$ 0.000	0.538 $\pm$ 0.155	0.000 $\pm$ 0.000	0.824 $\pm$ 0.213
34	$\alpha$ -Selineno *	1489	0.000 $\pm$ 0.000	0.316 $\pm$ 0.044	0.000 $\pm$ 0.000	0.638 $\pm$ 0.082
35	$\alpha$ -Farneseno	1503	0.000 $\pm$ 0.000	14.197 $\pm$ 1.869	0.000 $\pm$ 0.000	22.426 $\pm$ 3.490
36	TMTT <sup>1</sup>	1572	1.804 $\pm$ 0.512	1.781 $\pm$ 0.504	1.235 $\pm$ 0.225	1.484 $\pm$ 0.236
37	Cariofileno óxido	1585	0.000 $\pm$ 0.000	2.045 $\pm$ 0.290	0.000 $\pm$ 0.000	2.785 $\pm$ 0.530
38	Sesquiterpeno N.I. *	1674	0.000 $\pm$ 0.000	0.473 $\pm$ 0.083	0.000 $\pm$ 0.000	0.331 $\pm$ 0.088
39	Palmitato de metila	1923	0.717 $\pm$ 0.088	0.632 $\pm$ 0.048	0.419 $\pm$ 0.051	0.379 $\pm$ 0.087
Total		-	18.982 $\pm$ 4.384 b	188.664 $\pm$ 38.356 a	22.629 $\pm$ 6.549 b	202.570 $\pm$ 39.434 a

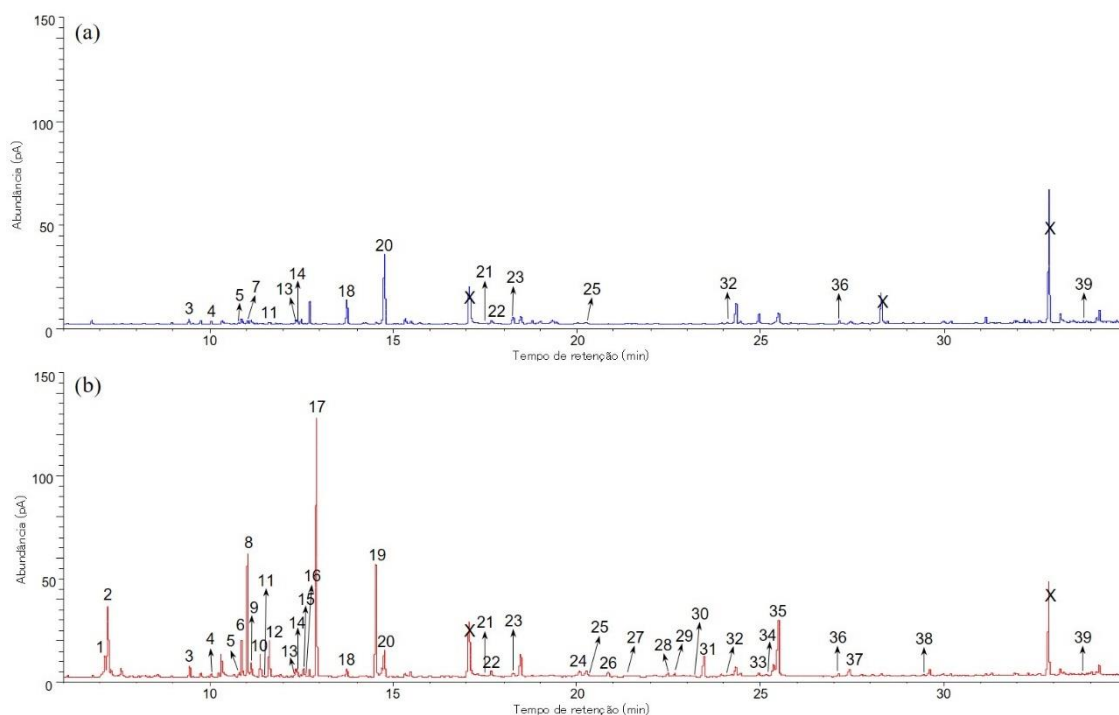
Obs.: valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, de acordo com GLM e Anova ( $\alpha = 95\%$ ).

\* Tentativa de identificação dos compostos.

<sup>1</sup> TMTT: (E,E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno.

IR: Índice de retenção calculado em coluna DB-5MS.

N.I.: Não identificado.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico dos compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis* (a) sem injúria de herbivoria (azul) e (b) com injúria de herbivoria (vermelho) provocada por *Spodoptera frugiperda*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 1 e X = contaminação.

Para o milho, todos os COVs identificados também foram encontrados em todas as replicatas do mesmo tratamento, ainda que em traços. Houve diferença significativa com relação à quantidade total de COVs emitidos pelo milho ao comparar os períodos 0-24 e 24-48 h para o controle ( $\chi^2 = 7,285$ ; gl = 1; p = 0,007), mas não houve diferença significativa para o tratamento ( $\chi^2 = 0,459$ ; gl = 1; p = 0,498). Também houve diferença ao comparar os COVs totais emitidos entre o controle e o tratamento nos dois períodos avaliados, para 0-24 h ( $\chi^2 = 42,043$ ; gl = 1; p < 0,001) e 24-48 h ( $\chi^2 = 113,56$ ; gl = 1; p < 0,001) (Figura 9b). No milho, os principais compostos produzidos em maior quantidade pelas plantas com injúria de herbivoria foram os voláteis de folhas verdes (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexen-1-ol e acetato de (*Z*)-3-hexenila, o monoterpeno linalol, o homoterpeno DMNT e o sesquiterpeno  $\beta$ -farneseno.

**Tabela 2.** Quantidade média dos compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético Spodoptera) emitidos por plantas saudias (controle) e plantas submetidas à injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*, coletados nos períodos 0-24 e 24-48 h (média  $\pm$  erro padrão, em ng/h).

N°	Composto	IR	Controle 0-24 h	Herbivoria 0-24 h	Controle 24-48 h	Herbivoria 24-48 h
1	Hexanal	803	0.000 $\pm$ 0.000	3.340 $\pm$ 0.905	0.000 $\pm$ 0.000	2.403 $\pm$ 0.226

2	(E)-2-Hexenal	855	0.000 ± 0.000	15.057 ± 5.398	0.000 ± 0.000	24.216 ± 10.874
3	(Z)-3-Hexen-1-ol	858	0.000 ± 0.000	6.453 ± 1.524	0.000 ± 0.000	9.319 ± 3.236
4	Acetato de isopentila *	877	0.000 ± 0.000	0.236 ± 0.038	0.000 ± 0.000	0.276 ± 0.059
5	α-Pineno	935	0.000 ± 0.000	0.342 ± 0.030	0.000 ± 0.000	0.338 ± 0.051
6	Canfeno	951	0.000 ± 0.000	0.312 ± 0.021	0.000 ± 0.000	0.102 ± 0.065
7	Benzaldeído	965	0.000 ± 0.000	1.148 ± 0.278	0.000 ± 0.000	1.220 ± 0.403
8	6-Metil-5-hepten-2-ona	985	0.653 ± 0.117	1.025 ± 0.244	0.323 ± 0.017	0.425 ± 0.058
9	β-Mirceno	989	0.756 ± 0.217	2.302 ± 0.421	0.548 ± 0.127	2.721 ± 0.662
10	Acetato de (Z)-3-hexenila	1004	0.000 ± 0.000	23.403 ± 6.382	0.000 ± 0.000	23.489 ± 6.652
11	Acetato de (E)-2-hexenila	1015	0.000 ± 0.000	3.111 ± 1.014	0.000 ± 0.000	1.798 ± 0.488
12	2-Etilhexan-1-ol	1029	1.243 ± 0.234	1.776 ± 0.411	0.909 ± 0.142	0.959 ± 0.198
13	Limoneno	1030	0.580 ± 0.064	0.740 ± 0.116	0.461 ± 0.092	0.487 ± 0.094
14	(E)-β-Ocimeno	1048	0.000 ± 0.000	0.718 ± 0.182	0.000 ± 0.000	0.993 ± 0.218
15	Benzoato de metila *	1095	0.000 ± 0.000	0.432 ± 0.070	0.000 ± 0.000	0.253 ± 0.036
16	Linalol	1099	2.251 ± 0.510	22.310 ± 4.224	0.991 ± 0.192	30.575 ± 4.573
17	Nonanal	1104	4.311 ± 1.015	4.418 ± 0.455	1.666 ± 0.367	1.786 ± 0.221
18	DMNT <sup>1</sup>	1113	0.871 ± 0.276	22.634 ± 5.124	0.419 ± 0.181	26.872 ± 4.659
19	Salicilato de metila	1194	0.000 ± 0.000	Traços	0.000 ± 0.000	Traços
20	Decanal	1206	3.669 ± 0.626	4.211 ± 0.637	1.975 ± 0.341	1.741 ± 0.212
21	Benzotiazol	1229	0.343 ± 0.147	0.780 ± 0.223	0.419 ± 0.104	0.667 ± 0.154
22	Indol	1292	0.000 ± 0.000	5.256 ± 1.063	0.000 ± 0.000	6.750 ± 1.503
23	Undecanal	1307	0.499 ± 0.070	0.642 ± 0.070	0.351 ± 0.020	0.428 ± 0.067
24	Ciclosativeno	1371	7.468 ± 1.156	8.641 ± 2.006	7.049 ± 0.932	8.254 ± 1.743
25	Acetato de geranila *	1377	0.000 ± 0.000	1.153 ± 0.276	0.000 ± 0.000	1.878 ± 0.462
26	β-Elemeno	1390	0.000 ± 0.000	0.335 ± 0.031	0.000 ± 0.000	0.411 ± 0.078
27	Dodecanal *	1406	0.000 ± 0.000	0.509 ± 0.061	0.000 ± 0.000	0.311 ± 0.025
28	β-Cariofileno	1422	0.000 ± 0.000	8.932 ± 2.911	0.000 ± 0.000	11.089 ± 2.825
29	α-Bergamoteno *	1434	0.000 ± 0.000	2.958 ± 1.084	0.000 ± 0.000	7.720 ± 2.312
30	trans Geranilacetona	1448	1.521 ± 0.372	1.809 ± 0.455	0.668 ± 0.104	0.488 ± 0.066
31	β-Farneseno	1452	0.602 ± 0.140	7.733 ± 2.225	0.373 ± 0.048	21.289 ± 5.061
32	α-Humuleno	1457	0.000 ± 0.000	2.618 ± 1.452	0.000 ± 0.000	2.087 ± 1.148
33	α-Muroleno	1494	0.000 ± 0.000	Traços	0.000 ± 0.000	Traços
34	Sesquiterpeno N.I. *	1498	0.000 ± 0.000	1.144 ± 0.213	0.000 ± 0.000	1.001 ± 0.287
35	β-Bisaboleno	1503	0.000 ± 0.000	1.199 ± 0.411	0.000 ± 0.000	1.018 ± 0.281
36	Sesquiterpeno N.I. *	1514	0.000 ± 0.000	0.604 ± 0.127	0.000 ± 0.000	0.721 ± 0.171
37	δ-Cadineno	1519	0.803 ± 0.176	0.977 ± 0.258	0.946 ± 0.100	0.936 ± 0.203
38	β-Sesquifelandreno	1525	0.000 ± 0.000	Traços	0.000 ± 0.000	Traços
39	Sesquiterpeno N.I. *	1528	0.000 ± 0.000	Traços	0.000 ± 0.000	Traços
40	Sesquiterpeno N.I. *	1538	0.000 ± 0.000	Traços	0.000 ± 0.000	Traços
41	TMTT <sup>2</sup>	1572	1.150 ± 0.437	3.370 ± 0.953	0.788 ± 0.125	4.065 ± 0.969
Total		-	26.719 ± 5.556 b	162.627 ± 41.291 a	17.888 ± 2.892 c	199.086 ± 50.339 a

Obs.: valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, de acordo com GLM e Anova ( $\alpha = 95\%$ ).

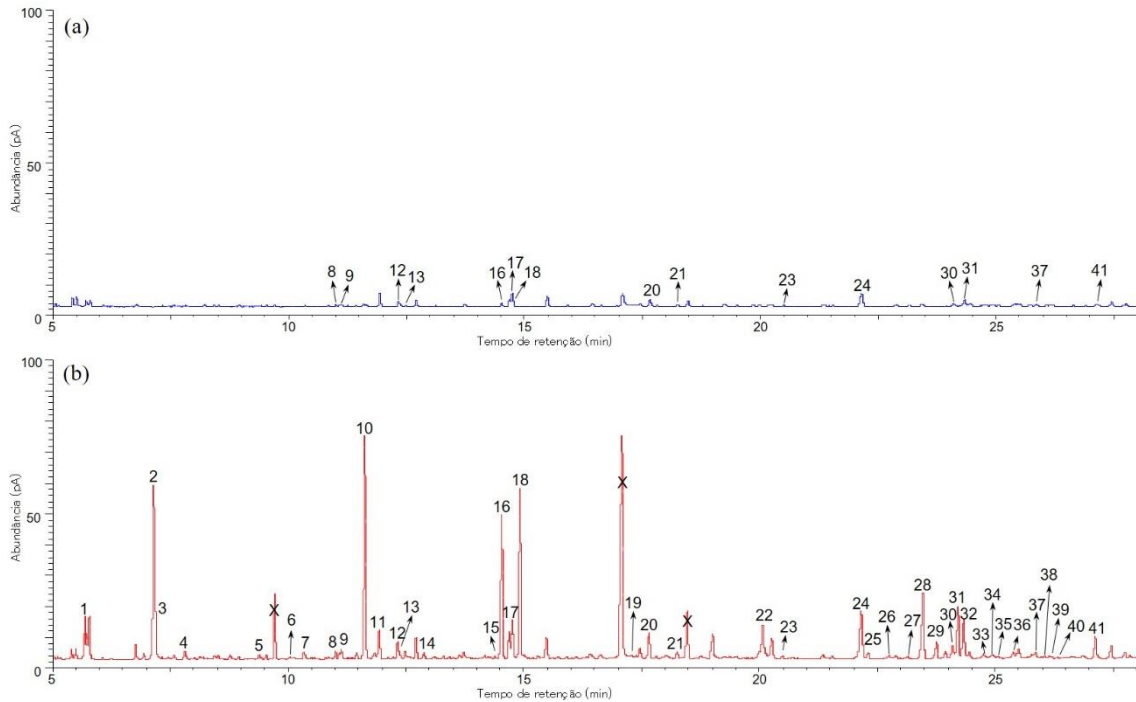
\* Tentativa de identificação dos compostos.

<sup>1</sup> DMNT: (E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno.

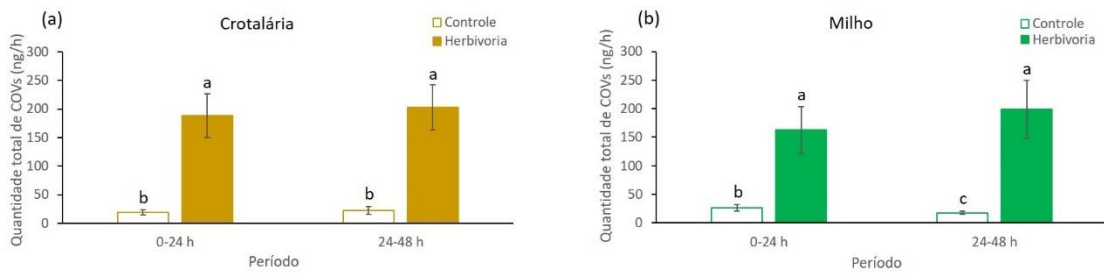
<sup>2</sup> TMTT: (E,E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno.

IR: Índice de retenção calculado em coluna DB-5MS.

N.I.: Não identificado.



**Figura 8.** Perfil cromatográfico dos compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético Spodoptera) **(a)** sem injúria de herbivoria (azul) e **(b)** com injúria de herbivoria (vermelho) provocada por *Spodoptera frugiperda*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 2 e X = contaminação.

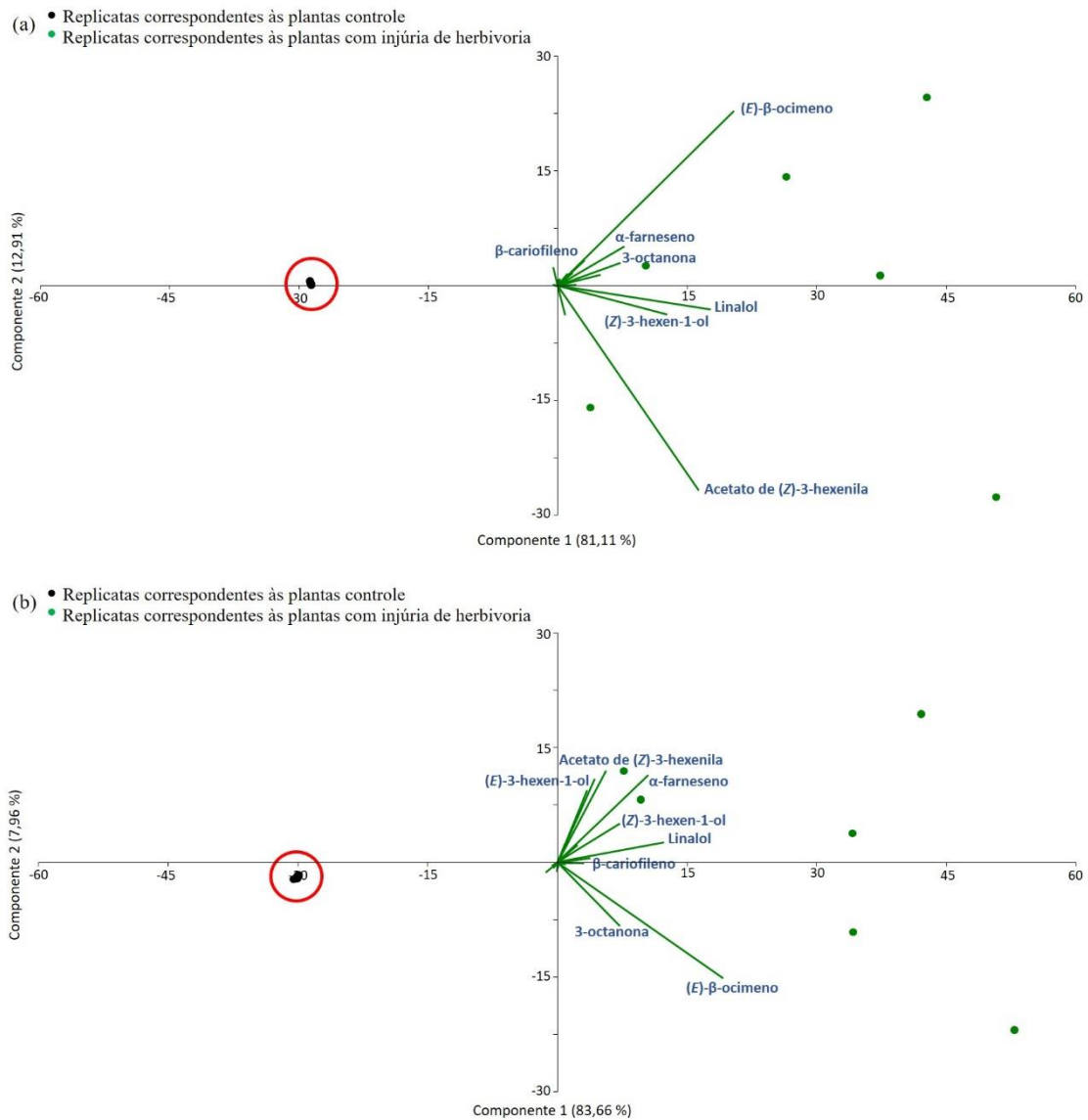


**Figura 9.** Quantidade total de compostos orgânicos voláteis emitidos por **(a)** *Crotalaria spectabilis* e **(b)** milho (genótipo Sintético Spodoptera) nos diferentes tratamentos e períodos avaliados. Barras seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, de acordo com GLM seguido de Anova ( $\alpha = 95\%$ ).



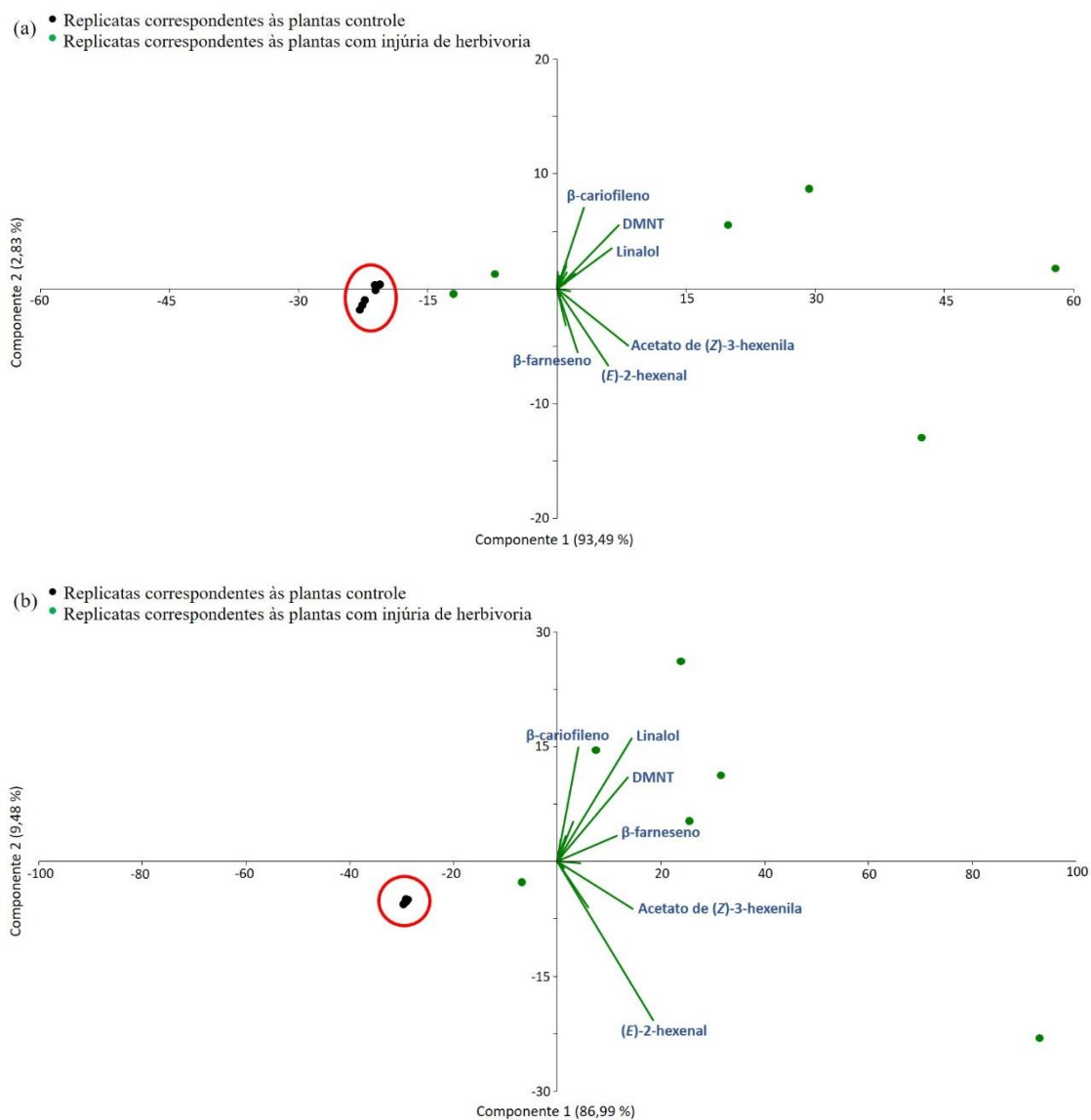
Dos 39 compostos detectados para a crotalária, 30 foram confirmados com padrões autênticos, 3 foram inferidos e 6 não foram identificados, enquanto para o milho, dos 41 compostos detectados, 32 foram confirmados com padrões autênticos, 5 foram inferidos e 4 não foram identificados. Os compostos confirmados e inferidos foram identificados através da comparação do padrão de fragmentação dos compostos da amostra com os dados catalogados em bibliotecas espectrais (que podem ser consultados no Apêndice I), e através da comparação do índice de retenção calculado com os valores constados na literatura. Os ésteres e sesquiterpenos não identificados tiveram sua classe química identificada através do padrão de fragmentação comum a essas classes. Os compostos canfeno,  $\alpha$ -terpineol, salicilato de metila,  $\alpha$ -muroleno e  $\beta$ -sesquifelandreno não foram quantificados devido à quantidade muito baixa produzida pelas plantas. Todos os compostos identificados são pertencentes às classes de álcoois, aldeídos, cetonas, compostos aromáticos, ésteres e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos e homoterpenos).

De acordo com os diagramas obtidos pela PCA (Figura 10) para os COVs emitidos pela crotalária, é possível observar a separação entre o controle (circulado em vermelho) e o tratamento, quase todos os compostos estão relacionados com o tratamento das plantas submetidas à injúria de herbivoria, e destaca-se a contribuição dos compostos (*E*)- $\beta$ -ocimeno e acetato de (*Z*)-3-hexenila para os voláteis emitidos de 0-24 h, que foram produzidos em maiores quantidades após a herbivoria e não foram observados no controle, e dos compostos acetato de (*Z*)-3-hexenila, (*E*)-3-hexen-1-ol, indol,  $\alpha$ -farneseno, (*Z*)-3-hexen-1-ol, linalol, 3-octanona e (*E*)- $\beta$ -ocimeno, para os voláteis emitidos de 24-48 h.



**Figura 10.** Análise de componentes principais dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *Crotalaria spectabilis*, com e sem injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*, nos períodos de (a) 0-24 e (b) 24-48 h. Circulado em vermelho está o tratamento controle.

Para os COVs emitidos pelo milho, é possível observar que os diagramas obtidos pela PCA (Figura 11) demonstraram separação entre o controle (circulado em vermelho) e o tratamento. Novamente todos os compostos estão relacionados ao tratamento das plantas submetidas à injúria de herbivoria, com uma contribuição significativa dos compostos  $\beta$ -cariofileno, DMNT, linalol, acetato de (Z)-3-hexenila, (E)-2-hexenal, e  $\beta$ -farneseno, tanto para os voláteis emitidos de 0-24 h, quanto de 24-48 h.



**Figura 11.** Análise de componentes principais dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelo milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), com e sem injúria de herbivoria provocada por *Spodoptera frugiperda*, nos períodos de (a) 0-24 e (b) 24-48 h. Circulado em vermelho está o tratamento controle.

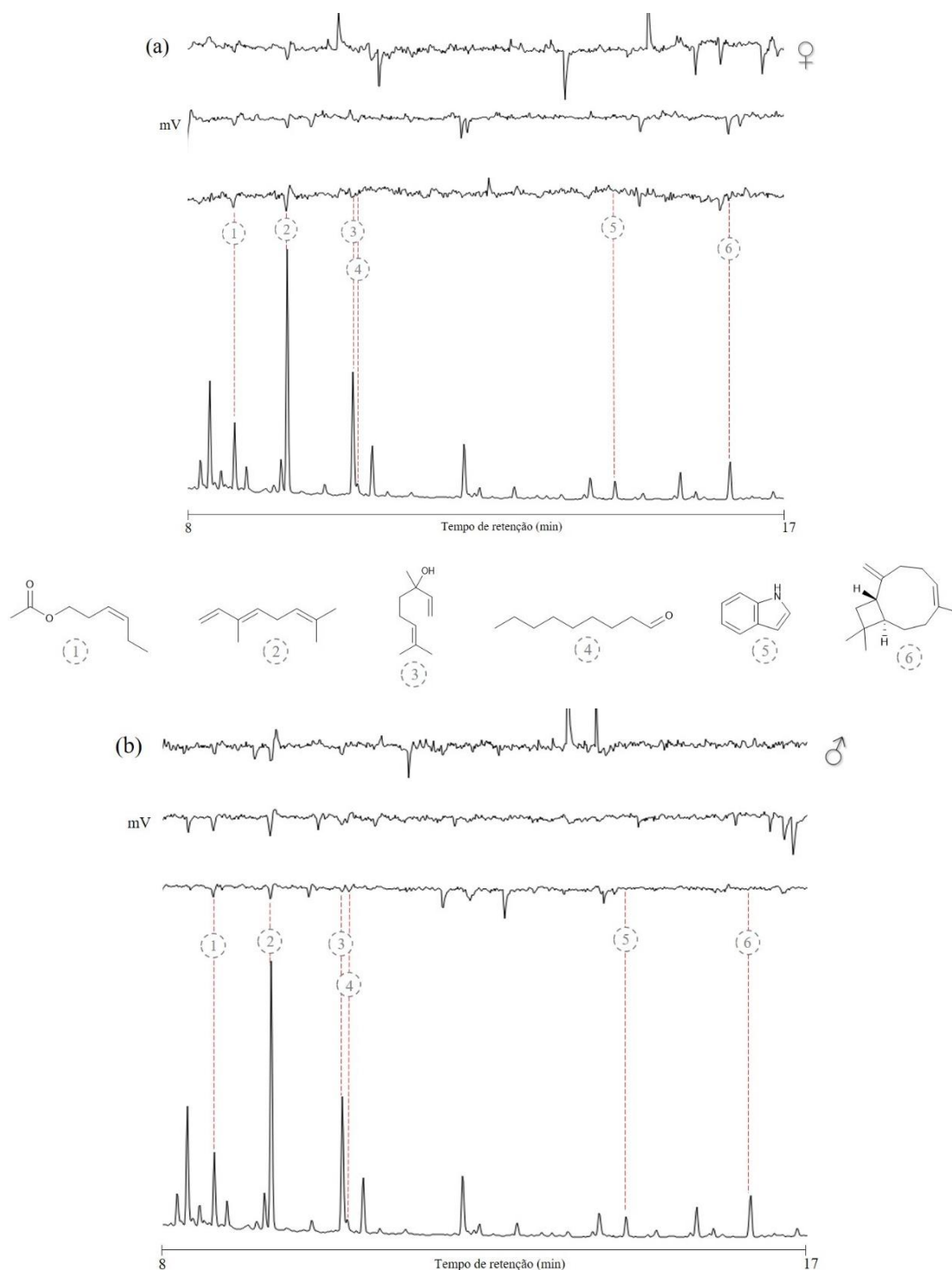
#### 4.2 Análises eletrofisiológicas

As análises de GC-EAD das antenas de fêmeas e de machos, virgens e acasalados de *S. frugiperda*, revelaram respectivamente seis e doze compostos eletrofisiologicamente ativos nos extratos de COVs de crotalária e de milho (Figuras 12 e 13). As antenas de fêmeas e de machos mostraram resposta eletrofisiológica para os compostos: (*E*)-2-hexenal, DMNT, salicilato de metila, decanal, ciclosativeno, TMTT, acetato de (*Z*)-3-hexenila, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, linalol, nonanal, indol e  $\beta$ -cariofileno, sendo os seis primeiros exclusivos para o milho e os seis últimos em comum aos dois extratos.

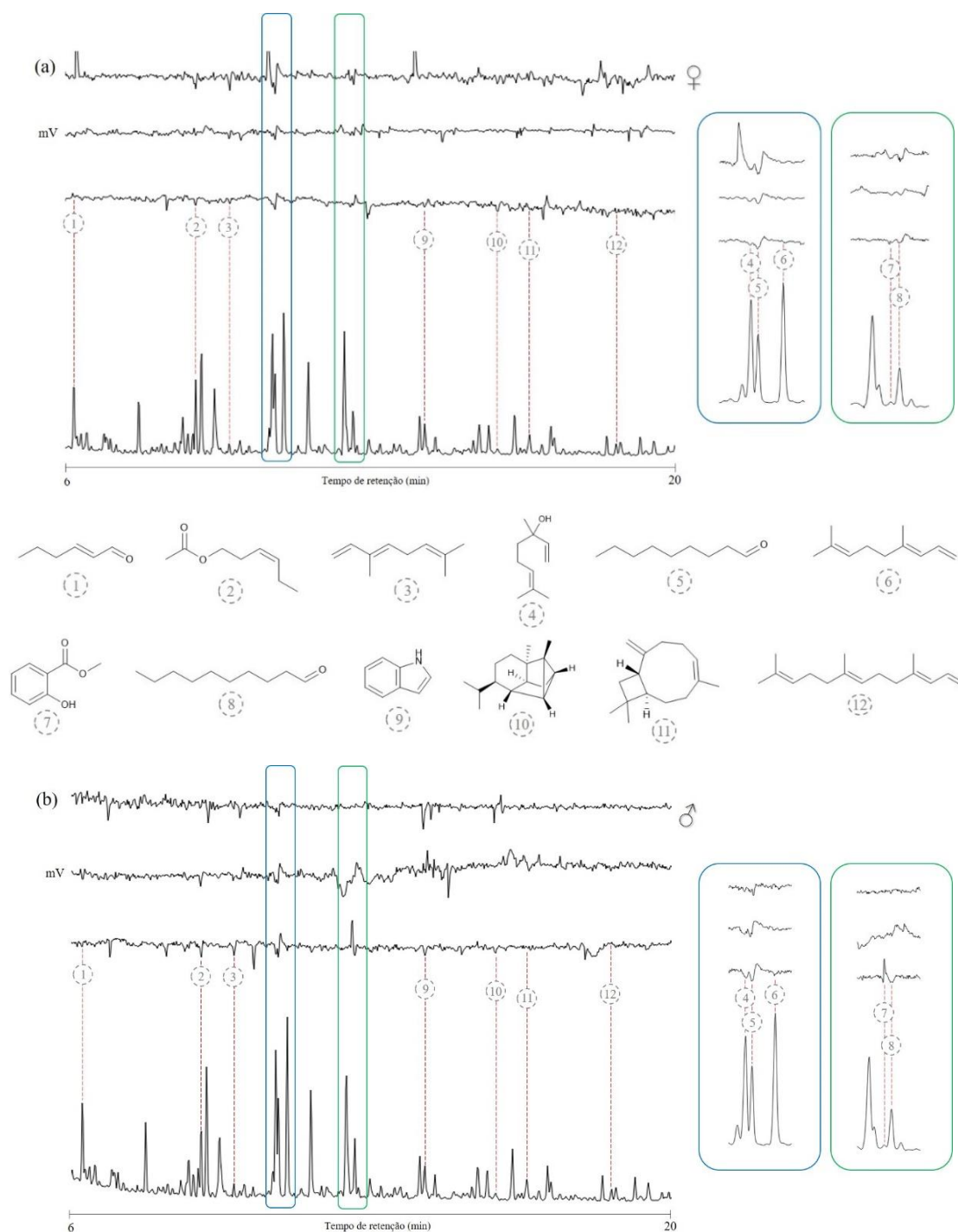
Nos três eletroantogramas correspondentes ao extrato de COVs de herbivoria em crotalária (Figura 12), é possível observar resposta inconclusiva para os compostos indol e  $\beta$ -cariofileno, comparada aos demais, mas que parecem ter indícios de resposta obtidas em outras replicatas (que podem ser conferidas no Apêndice II), que foram confirmadas através dos pulsos feitos com os padrões sintéticos (Figura 14).

Nos três eletroantogramas correspondentes ao extrato de COVs de herbivoria em milho (Figura 13), é possível observar que os compostos salicilato de metila e decanal tiveram resposta mais conclusiva para as fêmeas em comparação aos machos, sendo o salicilato de metila um composto atrativo para a oviposição de fêmeas de *S. frugiperda* (Yactayo-Chang et al., 2021). Os compostos indol, ciclosativeno,  $\beta$ -cariofileno e TMTT tiveram uma resposta baixa tanto para as fêmeas quanto para os machos, comparado aos demais compostos, que em consequência dos ruídos, podem ter tido o sinal suprimido (sinais para esses compostos obtidos em outras replicatas podem ser conferidos no Apêndice II). Ainda assim, sugerimos que a antena responde para esses quatro compostos, pois os pulsos feitos com os padrões sintéticos demonstraram respostas eletrofisiológicas (Figura 14).

Os eletroantogramas das Figuras 12 e 13 são representativos para fêmeas e machos virgens e acasalados, de forma que não foi observada diferença de resposta com relação às condições sexuais das mariposas.

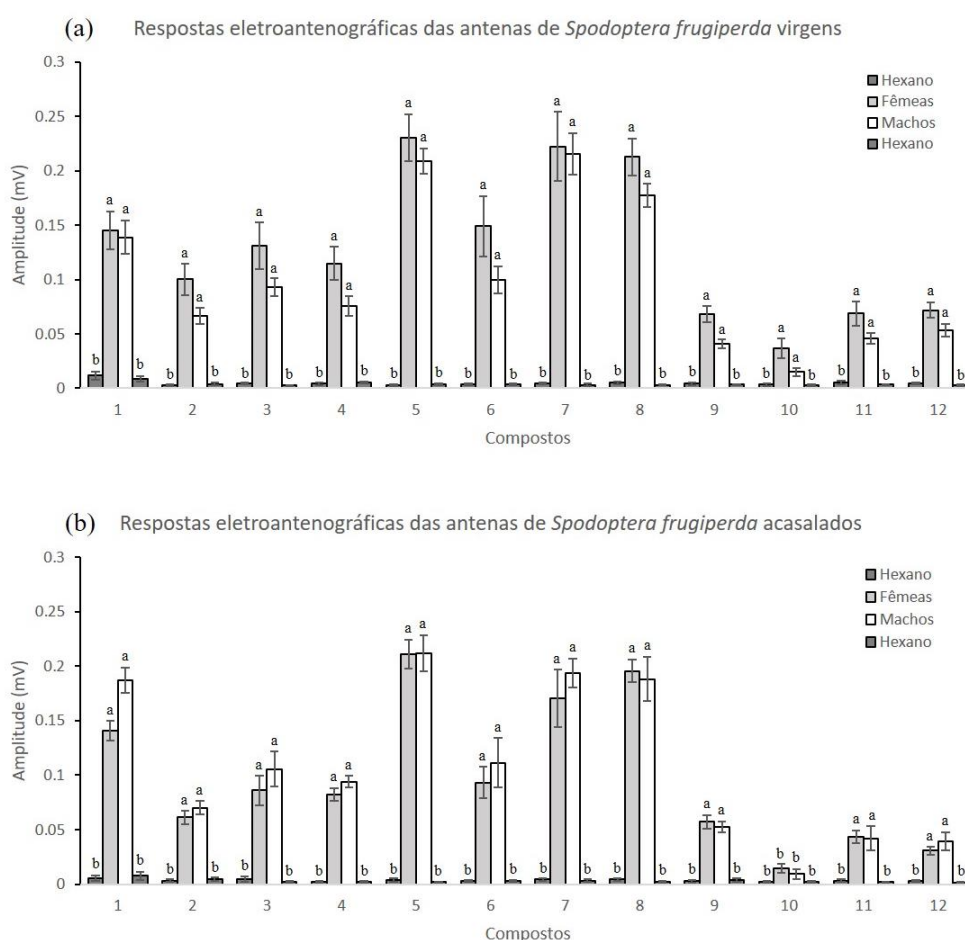


**Figura 12.** Respostas das antenas de **(a)** fêmeas e **(b)** machos de *Spodoptera frugiperda* ao extrato de compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis* com herbivoria provocada pelas lagartas *S. frugiperda*, em análise por cromatografia gasosa acoplada a um detector de eletroantenografia (GC-EAD). Os três gráficos superiores representam os sinais das respostas das antenas obtidos pelo detector de eletroantenografia, e a resposta inferior corresponde ao cromatograma do extrato, obtido pelo detector de ionização de chama. Os compostos eletrofisiologicamente ativos foram: **1.** acetato de (Z)-3-hexenila; **2.** (E)-β-ocimeno; **3.** linalol; **4.** nonanal; **5.** indol; **6.** β-cariofileno.



**Figura 13.** Respostas das antenas de (a) fêmeas e (b) machos de *Spodoptera frugiperda* ao extrato de compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), com herbivoria provocada pelas lagartas *S. frugiperda*, em análise por cromatografia gasosa acoplada a um detector de eletroantografia (GC-EAD). Os três gráficos superiores representam os sinais das respostas das antenas obtidos pelo detector de eletroantografia, e a resposta inferior corresponde ao cromatograma do extrato, obtido pelo detector de ionização de chama. Os compostos eletrofisiologicamente ativos foram: **1.** (*E*)-2-hexenal; **2.** acetato de (*Z*)-3-hexenila; **3.** (*E*)- $\beta$ -ocimeno; **4.** linalol; **5.** nonanal; **6.** DMNT; **7.** salicilato de metila; **8.** decanal; **9.** indol; **10.** ciclosativeno; **11.**  $\beta$ -cariofileno; **12.** TMTT.

Foram também avaliadas as respostas eletroantenográficas (EAG) das antenas de fêmeas e de machos, virgens e acasalados, e os resultados mostraram que os insetos também respondem aos compostos sintéticos e que a condição fisiológica do inseto não interferiu na resposta, visto que no GC-EAD, as antenas responderam para um total de doze compostos, e que essas respostas foram confirmadas ao mostrarem diferenças significativas às soluções contendo os padrões puros de cada composto a 1,0 mg/mL em hexano, quando comparado com a resposta da antena somente ao hexano, com exceção do ciclosativeno para os insetos acasalados, que não teve diferença significativa em relação ao controle hexano, apresentando uma resposta marginal (Figura 14, Tabela 3).



**Figura 14.** Respostas eletroantenográficas (EAG) (média  $\pm$  erro padrão) das antenas de (a) fêmeas e machos virgens e (b) acasalados de *Spodoptera frugiperda*, às soluções sintéticas de padrões puros de concentração 1,0 mg/mL. Compostos: **1.** (*E*)-2-hexenal; **2.** acetato de (*Z*)-3-hexenila; **3.** (*E*)- $\beta$ -ocimeno; **4.** linalol; **5.** nonanal; **6.** DMNT; **7.** salicilato de metila; **8.** decanal; **9.** indol; **10.** ciclosativeno; **11.**  $\beta$ -cariofileno; **12.** TMTT. As respostas eletrofisiológicas foram comparadas em relação ao hexano (controle), usando teste-*t* uni-caudal. Barras seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, de acordo com o teste-*t* ( $\alpha = 95\%$ ).

**Tabela 3.** Valores da análise estatística das respostas eletrofisiológicas das antenas de fêmeas e de machos, virgens e acasalados de *Spodoptera frugiperda*, aos compostos sintéticos da planta comparadas em relação ao hexano (controle). A resposta dos compostos foi analisada usando teste-*t* uni-caudal.

	Fêmeas virgens	Machos virgens	Fêmeas acasaladas	Machos acasalados
	teste- <i>t</i>	teste- <i>t</i>	teste- <i>t</i>	teste- <i>t</i>
( <i>E</i> )-2-Hexenal	t=7,496; p<0,001	t=8,372; p<0,001	t=14,335; p<0,001	t=14,572; p<0,001
Acetato de ( <i>Z</i> )-3-hexenila	t=6,808; p<0,001	t=8,448; p<0,001	t=9,617; p<0,001	t=10,607; p<0,001
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	t=5,926; p<0,001	t=10,761; p<0,001	t=5,948; p<0,001	t=6,511; p<0,001
Linalol	t=7,164; p<0,001	t=7,587; p<0,001	t=13,762; p<0,001	t=17,997; p<0,001
Nonanal	t=10,396; p<0,001	t=17,225; p<0,001	t=15,385; p<0,001	t=12,541; p<0,001
DMNT <sup>1</sup>	t=5,229; p<0,001	t=7,774; p<0,001	t=6,241; p<0,001	t=4,773; p<0,001
Salicilato de metila	t=6,814; p<0,001	t=11,076; p<0,001	t=6,205; p<0,001	t=13,958; p<0,001
Decanal	t=12,286; p<0,001	t=16,206; p<0,001	t=18,680; p<0,001	t=9,167; p<0,001
Ciclosativeno	t=3,673; p<0,001	t=2,887; p=0,004	t=3,149; p=0,007	t=1,637; p=0,070
Indol	t=8,629; p<0,001	t=9,204; p<0,001	t=8,427; p<0,001	t=9,077; p<0,001
$\beta$ -Cariofileno	t=5,718; p<0,001	t=8,585; p<0,001	t=7,024; p<0,001	t=3,598; p=0,004
TMTT <sup>2</sup>	t=9,100; p<0,001	t=8,637; p<0,001	t=7,192; p<0,001	t=4,455; p=0,001

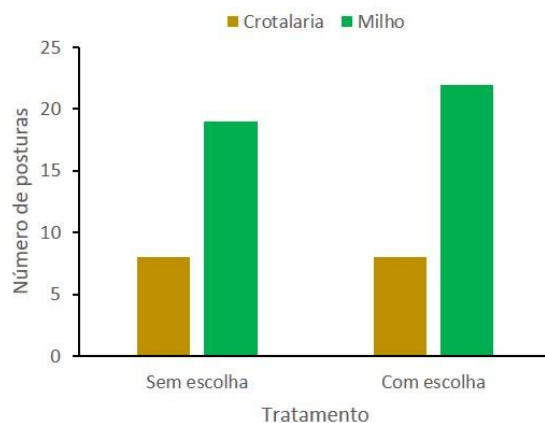
<sup>1</sup> DMNT: (*E*)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno.

<sup>2</sup> TMTT: (*E,E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno.

#### 4.3 Bioensaio de oviposição em gaiolas

Os bioensaios comportamentais para avaliar a preferência de oviposição das fêmeas de *S. frugiperda* nas plantas de crotalária e de milho, mostraram que elas ovipositaram preferencialmente nas plantas de milho. Considerando a quantidade total de posturas ao longo dos sete dias, houve diferença significativa no número de posturas realizadas no milho comparada à crotalária, tanto para os experimentos sem escolha ( $\chi^2 = 4,615$ ; gl = 1; p = 0,032), quanto para os experimentos com escolha ( $\chi^2 = 6,794$ ; gl = 1; p = 0,009), como pode ser observado na Figura 15.

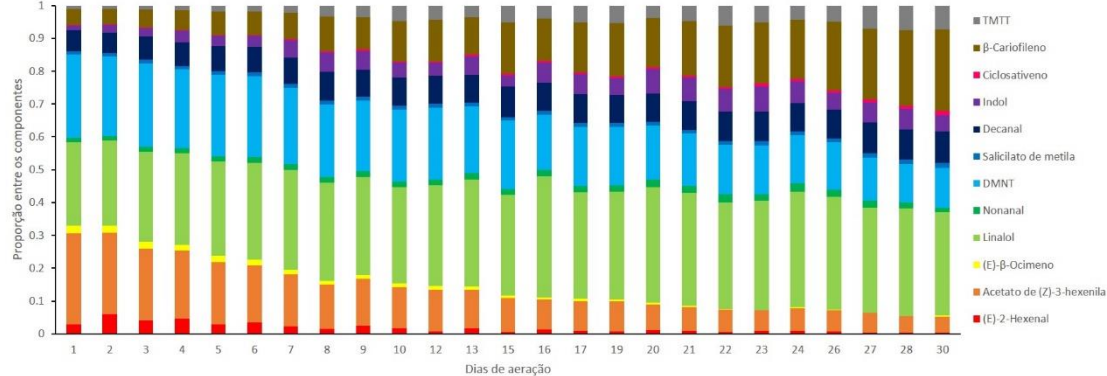




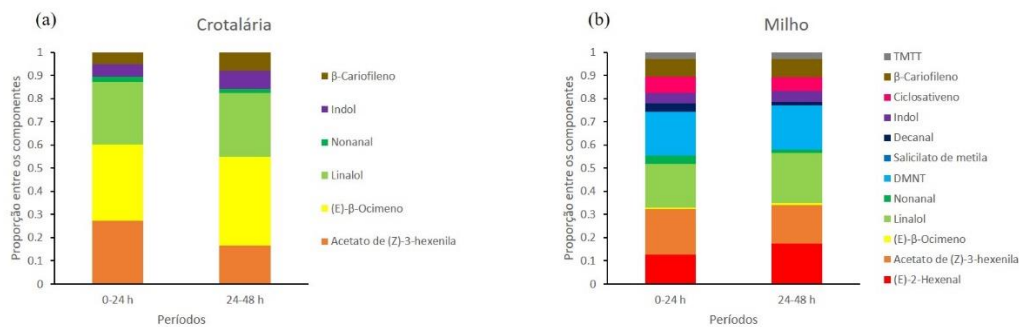
**Figura 15.** Quantidade total de posturas das fêmeas de *Spodoptera frugiperda* nas plantas de *Crotalaria spectabilis* e milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), ao longo dos sete dias, nos experimentos sem e com chance de escolha (N = 7).

#### 4.4 Proporção de liberação dos compostos dos septos utilizados nos bioensaios em túnel de vento

Através das aerações dos septos contendo os doze compostos que obtiveram resposta eletrofisiológica na técnica de eletroantenografia, foi possível determinar o comportamento de variação dos compostos através da proporção de liberação entre eles ao longo de 30 dias. A partir do gráfico da Figura 16, foi possível observar que compostos mais voláteis como (*E*)-2-hexenal, acetato de (*Z*)-3-hexenila e (*E*)- $\beta$ -ocimeno diminuem a proporção de liberação com o passar dos dias. Enquanto compostos menos voláteis como  $\beta$ -cariofileno e TMTT têm sua proporção aumentada com o passar dos dias. Essa proporção de liberação dos compostos impregnados nos septos de borracha pode ser comparada à proporção natural de liberação das plantas (Figura 17).



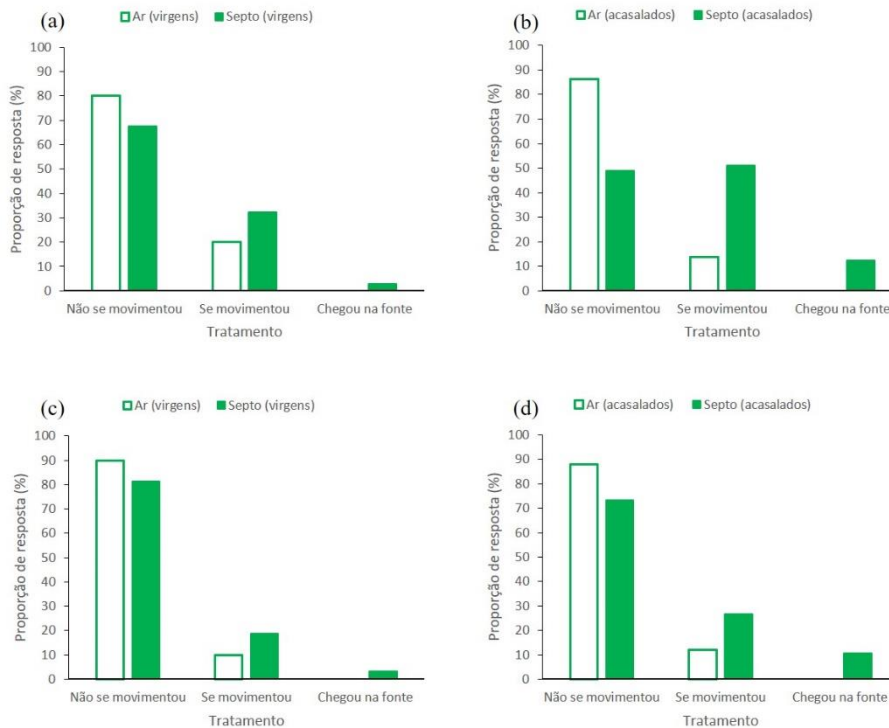
**Figura 16.** Proporção de liberação entre os doze compostos contidos nos septos de borracha, que obtiveram resposta eletrofisiológica na técnica de eletroantenografia, ao longo de 30 dias.



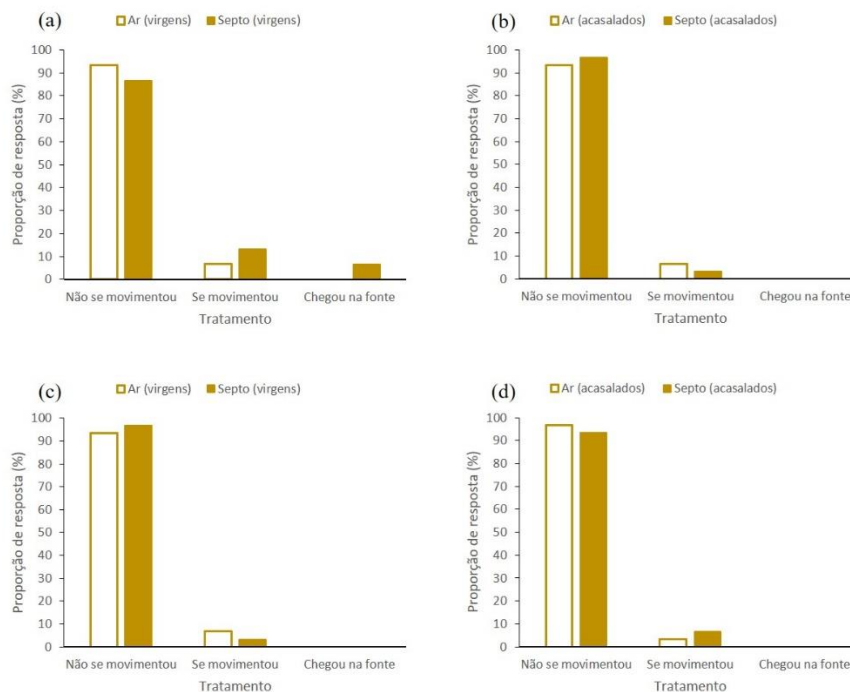
**Figura 17.** Proporção de liberação entre os compostos que obtiveram resposta eletrofisiológica na técnica de eletroantenografia, na proporção em que as plantas de (a) *Crotalaria spectabilis* e (b) milho (genótipo Sintético Spodoptera) liberam nos períodos de 0-24 e 24-48 h.

#### 4.5 Bioensaios em túnel de vento

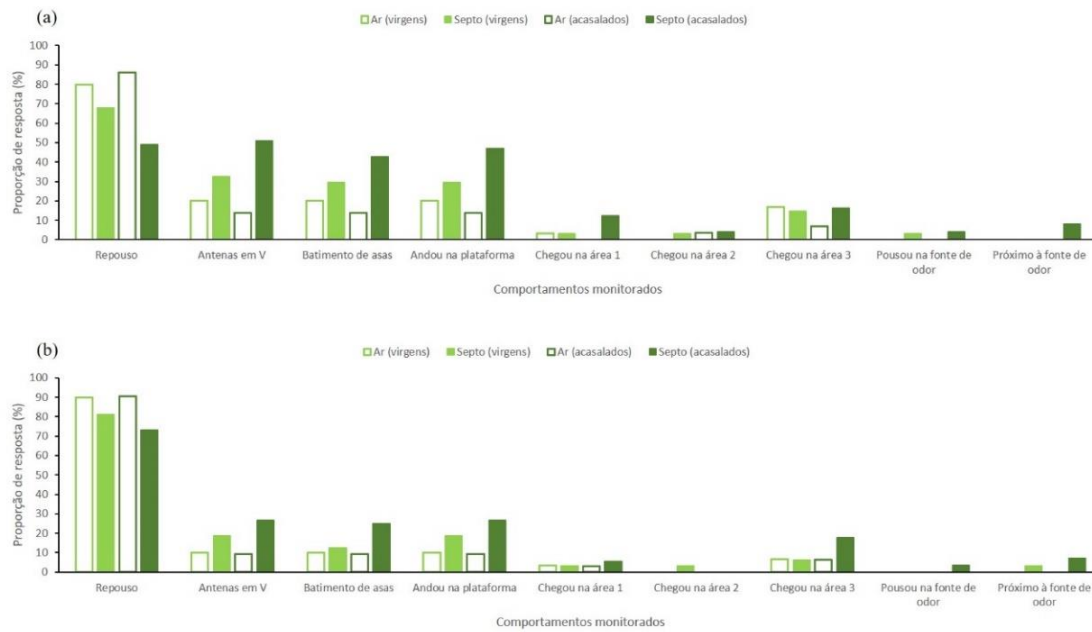
Os bioensaios comportamentais em túnel de vento mostraram que as mariposas de *S. frugiperda* foram capazes de distinguir os COVs emitidos por plantas de crotalária e de milho quando injuriadas por lagartas coespecíficas. Considerando a quantidade total de replicatas para cada sexo e condição sexual (virgem ou acasalado), foi observado que para o septo contendo os voláteis do milho, 32,35 e 51,02% das fêmeas virgens e acasaladas, respectivamente, se movimentaram no túnel, enquanto para os machos, foram observados movimentos em 18,75 e 26,78% dos virgens e acasalados (Figura 18). Já para o septo contendo os voláteis da crotalária, apenas 13,33 e 3,33% das fêmeas virgens e acasaladas, respectivamente, se movimentaram no túnel, enquanto para os machos, foram observados movimentos em apenas 3,33 e 6,66% dos virgens e acasalados, ou seja, aproximadamente cerca de 90% das mariposas se mantiveram em repouso nesses tratamentos (Figura 19). As proporções de todas as respostas comportamentais monitoradas das mariposas em relação aos tratamentos com septos contendo os compostos voláteis do milho ou da crotalária, e seus respectivos controles (ar), estão apresentados nas Figuras 20 e 21.



**Figura 18.** Respostas de mariposas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaios em túnel de vento para o tratamento do septo contendo os compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), e o controle em relação ao ar, considerando (a) fêmeas virgens, (b) fêmeas acasaladas, (c) machos virgens e (d) machos acasalados.



**Figura 19.** Respostas de mariposas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaios em túnel de vento para o tratamento do septo contendo os compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis*, e o controle em relação ao ar, considerando (a) fêmeas virgens, (b) fêmeas acasaladas, (c) machos virgens e (d) machos acasalados.



**Figura 20.** Proporção das respostas comportamentais das mariposas em relação ao tratamento com septo contendo os compostos orgânicos voláteis do milho (genótipo Sintético *Spodoptera*), e o controle em relação ao ar, avaliando os seguintes aspectos: repouso (sem resposta), antenas em V, batimento de asas, andar na plataforma, chegar nas áreas 1, 2 ou 3, pousar na fonte de odor ou próximo a ela, para (a) fêmeas e (b) machos.



**Figura 21.** Proporção das respostas comportamentais das mariposas em relação ao tratamento com septo contendo os compostos orgânicos voláteis de *Crotalaria spectabilis*, e o controle em relação ao ar, avaliando os seguintes aspectos: repouso (sem resposta), antenas em V, batimento de asas, andar na plataforma, chegar nas áreas 1, 2 ou 3, pousar na fonte de odor ou próximo a ela, para (a) fêmeas e (b) machos.

## 5. DISCUSSÃO

As plantas estão em constante comunicação com os organismos em seu ambiente, por meio dos COVs, que são produzidos e liberados em diferentes quantidades e proporções (Dudareva et al., 2004; Bouwmeester et al., 2019). Esses COVs geralmente são emitidos na atmosfera em pequenas quantidades quando as plantas estão saudáveis e intactas, mas durante a infestação por herbívoros ou patógenos, a injúria causada por estes estressores ativa a defesa das plantas, desencadeando uma cascata de respostas metabólicas, que inclui a liberação de compostos voláteis em maiores quantidades pela planta, e esses voláteis podem ser usados na defesa das plantas, tanto diretamente contra o herbívoro, como indiretamente atraindo inimigos naturais dos herbívoros (Das et al., 2013).

Essa indução de compostos voláteis foi observada em nossos estudos nas plantas de crotalária e de milho, quando infestadas com as lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Interessante notar que mesmo a *S. frugiperda* não sendo uma praga que ataca plantas de crotalária na natureza, estas plantas responderam à injúria de herbivoria provocada por este inseto, produzindo um perfil de voláteis diferente das plantas sadias. Esse resultado sugere que provavelmente é uma resposta inata das plantas de *C. spectabilis* à injúria de herbivoria ou injúria mecânica provocada pelo inseto quando se alimenta da planta. Estudos futuros precisam ser conduzidos para avaliar se os voláteis emitidos pela planta de crotalária estão relacionados com o sistema de defesa, isto é, se estes voláteis têm alguma ação deletéria para a mariposa ou se é atrativo aos inimigos naturais da mariposa, por exemplo. Os compostos induzidos pela herbivoria nas plantas de milho são compostos que já foram relatados na literatura como compostos relacionados com a defesa da planta, por atraírem os inimigos naturais da mariposa *S. frugiperda*, como o parasitoide de ovos *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) (Michereff et al., 2019).

Nas plantas de crotalária e de milho no estágio vegetativo, após injúrias causadas por herbivoria da lagarta *S. frugiperda*, foi possível observar uma grande diferença quantitativa e qualitativa em relação aos voláteis emitidos comparando com as plantas controle, sendo que os principais compostos estavam majoritariamente relacionados com a rota metabólica dos terpenos e das lipoxigenases. Isso pode ser relacionado com o tipo de injúria causada pelo herbívoro. Geralmente, as injúrias causadas por insetos sugadores ativam a emissão de compostos provenientes da rota do chiquimato, enquanto insetos

mastigadores ativam a emissão de compostos relacionados com a rota do ácido jasmônico e a rota das lipoxigenases (Schweiger et al., 2014; Vincenti et al., 2019). As injúrias nas plantas aqui estudadas, causadas pela herbivoria da lagarta mastigadora *S. frugiperda*, induziram a emissão de uma série de voláteis de folhas verdes (provenientes da rota das lipoxigenases) e terpenos.

Os resultados também mostraram diferença qualitativa nos perfis de COVs quando se comparou o perfil da crotalária com o do milho, o que já era esperado, pois a composição dos COVs emitidos por plantas é frequentemente espécie-específica, ou seja, mesmo que as plantas estejam infestadas pela mesma ou diferentes espécies de herbívoros, os voláteis emitidos pelas diferentes espécies vegetais apresentarão diferenças (Dicke, 2007; Das et al., 2013). Essa variabilidade de compostos que cada planta pode emitir após a herbivoria é de grande importância para as defesas direta e indireta, pois podem atuar intoxicando o herbívoro (defesa direta) e podem agir como sinais de atração de seus inimigos naturais (defesa indireta), como parasitoides e predadores (McCormick et al., 2012; Turlings & Erb, 2018; Bouwmeester et al., 2019).

Os compostos 1-octen-3-ol, 3-octanona, 3-octanol, octanal, 2-aminobenzoato de metila,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -selineno, cariofileno óxido e palmitato de metila, foram produzidos somente pela crotalária após a injúria por herbivoria. Destaca-se que os três primeiros compostos dessa lista não são comumente relatados em plantas, mas são conhecidos por serem liberados por fungos (Silva et al., 2022) e outros microrganismos (Wang et al., 2016). Como esses compostos apareceram após o ataque da lagarta, eles podem ser uma consequência da presença da saliva da lagarta na planta, que pode conter vírus, fungos e bactérias, que podem colonizar a planta e produzir os compostos, ou mesmo serem produzidos por fungos endofíticos, que já estão presentes na planta. Não existem evidências para saber ao certo se isso foi uma produção direta da planta ou se existe algum microrganismo proveniente da planta ou da lagarta, que produziu esses compostos, além do fato de que pouco se sabe sobre a composição dos voláteis liberados por plantas do gênero *Crotalaria*. Prada e colaboradores (2021) analisaram a emissão de COVs de *C. nitens* após o ataque da Lepidoptera *U. ornatix*, um herbívoro especialista, e também identificaram esses três compostos, entre outros em comum com os identificados neste trabalho, como (*E*)- $\beta$ -ocimeno, acetato de (*Z*)-3-hexenila, (*Z*)-3-hexen-1-ol, linalol,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -farneseno e indol. Além disso, foram identificados alguns compostos diferenciais entre as duas espécies de crotalária estudadas, mostrando que plantas do

mesmo gênero, injuriadas pelas diferentes espécies de lagartas, induzem uma resposta diferente nas plantas em termos de produção de voláteis.

Embora exista essa variabilidade qualitativa, uma ampla gama de espécies de plantas emitem um perfil qualitativo de voláteis muito semelhantes, mas em proporções diferentes, como por exemplo os terpenos (*E*)- $\beta$ -ocimeno, linalol e  $\beta$ -cariofileno, e os voláteis de folhas verdes (*Z*)-3-hexen-1-ol e acetato de (*Z*)-3-hexenila (Kigathi et al., 2009; Danner et al., 2011; McCormick et al., 2012; Michereff et al., 2019), e a proporção entre os componentes é que dá a especificidade para as plantas, sendo uma informação utilizada na comunicação planta-planta e planta-inseto (Dudareva et al., 2013).

Os COVs produzidos por plantas de milho após o ataque da lagarta especialista *S. frugiperda* já foram anteriormente descritos por Michereff e colaboradores (2019), que revelaram a emissão de 21 compostos. Todos os 21 compostos foram identificados neste trabalho, com o acréscimo de 16 novos compostos, entre eles hexanal, acetato de isopentila,  $\alpha$ -pineno, benzaldeído, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-etilhexan-1-ol, limoneno, nonanal, salicilato de metila, decanal, undecanal,  $\beta$ -elemeno, dodecanal,  $\alpha$ -muroleno,  $\beta$ -bisaboleno e  $\beta$ -sesquifelandreno. As diferenças no perfil químico podem estar relacionadas às características genéticas de cada genótipo de milho e às condições de cultivo, e podem ser decorrentes da resposta específica das plantas de milho aos herbívoros utilizados (Michereff et al., 2019). Como usamos o mesmo genótipo de milho, Sintético *Spodoptera*, e o mesmo herbívoro, as diferenças observadas no perfil de voláteis devem estar relacionadas com as condições de cultivo, como adubação e luminosidade.

Nossos resultados mostraram que os compostos voláteis emitidos por milho e crotalária são reconhecidos pela mariposa *S. frugiperda*, que tem receptores para alguns destes compostos nas antenas, indicando que são usados como possível informação da condição das plantas. *Spodoptera frugiperda* tem receptores para vários compostos voláteis, indicando que provavelmente não utiliza um único composto para encontrar sua planta hospedeira, e que além da qualidade, provavelmente a proporção entre os componentes deva ser importante. A crotalária e o milho têm compostos em comum, mas em proporções diferentes, e isso deve permitir à mariposa, juntamente com toda a mistura de voláteis, identificar que são plantas diferentes.

Embora os compostos decanal, indol e TMTT também tenham sido identificados nos extratos de COVs de herbivoria em crotalária, por estarem presentes em menores quantidades nesses extratos em comparação aos de milho, não apresentaram resposta eletrofisiológica. O que pode justificar este acontecimento é o fato de as respostas das

antenas serem dose-dependente (Rharrabe et al., 2014), ou seja, provavelmente esses compostos só seriam percebidos em maiores concentrações. As respostas por eletrofisiologia são somente um indicativo de que um composto pode ter um efeito comportamental, ou seja, uma resposta positiva no EAG não quer dizer que o composto terá ação comportamental. Somente após estudos de bioensaios comportamentais, é que se pode confirmar a ação de um determinado composto sobre um inseto.

Através dos bioensaios em túnel de vento conduzidos neste trabalho, foi possível observar que as mariposas de *S. frugiperda* tiveram diferentes respostas comportamentais apenas para os voláteis do milho, o que pode ser um indicativo de que elas reconhecem os voláteis para localizar essas plantas. Entretanto, cerca de 90% das mariposas avaliadas no segundo tratamento, não demonstraram ação comportamental para os voláteis da crotalária, mesmo apresentando resposta eletrofisiológica no EAG. Dessa forma, os resultados sugerem que os seis compostos presentes no septo da crotalária (acetato de (*Z*)-3-hexenila, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, linalol, nonanal, indol e  $\beta$ -cariofileno), mesmo também estando presentes no septo do milho, não foram suficientes para produzir uma resposta comportamental nas mariposas, de forma que os outros seis compostos ((*E*)-2-hexenal, DMNT, salicilato de metila, decanal, ciclosativeno e TMTT), exclusivos para o milho, devem possuir relevância na localização desta planta, assim como a proporção entre eles e os demais compostos. Além disso, vale ressaltar que dentre as condições avaliadas das mariposas, as fêmeas acasaladas apresentaram maior porcentagem de respostas comportamentais em relação aos voláteis do milho, o que nos leva a concluir que elas podem utilizar esses voláteis para encontrar a planta hospedeira e depositar seus ovos.

A atração por voláteis induzidos por herbivoria já foi demonstrada para *S. frugiperda* e outras lagartas do gênero *Spodoptera*. Carroll e colaboradores (2006) mostraram que as lagartas *S. frugiperda* são significativamente mais atraídas por odores de plantas hospedeiras danificadas por herbívoros coespecíficos, comparada à atração a plantas não danificadas. Os estudos comportamentais conduzidos indicaram que o monoterpene linalol foi o composto responsável pela atratividade. As lagartas *S. littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) também foram atraídas pelos COVs emitidos por plantas com injúria de herbivoria por lagartas coespecíficas (von Mérey et al., 2013). Em outro estudo, foi demonstrado que a seleção de plantas de repolho pela lagarta *S. litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) estava positivamente correlacionada com a liberação dos compostos (*E*)-2-hexenal, 1-butenol, 4-isotiocianato e decanal, e negativamente correlacionada com a liberação dos compostos limoneno, nonanal, hexadecano,



heptadecano e octadecano, mostrando que a lagarta é capaz de reconhecer diferentes perfis de voláteis (Du et al., 2022). Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que as lagartas têm uma menor preferência pelas plantas de repolho já injuriadas por herbivoria de coespecíficos, o que demonstra que *S. litura* pode utilizar essa informação para encontrar os hospedeiros mais adequados e evitar possíveis competidores pela planta hospedeira.

Os compostos voláteis induzidos por herbivoria liberados pelas plantas são usados como informação pelos insetos para encontrar alimento, sítio de oviposição ou proteção (Dicke & Baldwin, 2010; von Mérey et al., 2013). Estudos com mariposas da ordem Lepidoptera mostraram que estas forrageiam plantas hospedeiras para depositar seus ovos, e que também podem ser repelidas por COVs induzidos por herbívoros, provavelmente para evitar competição e inimigos naturais (von Mérey et al., 2013). Esta ocorrência foi observada no comportamento das mariposas *U. ornatix*, que reduziram significativamente sua oviposição em plantas de *C. nitens* previamente atacadas, preferindo as plantas intactas (Prada et al., 2021). Levando em conta esse comportamento, muitos estudos investigaram a relação entre a preferência de oviposição de fêmeas adultas e o desempenho de seus descendentes, concluindo que as fêmeas põem mais ovos nos tipos de plantas propícios ao desempenho da prole (Gripenberg et al., 2010; Silva et al., 2017).

Os bioensaios conduzidos de preferência de oviposição mostraram uma clara preferência das mariposas de *S. frugiperda* de ovipositarem nas plantas de milho em relação às plantas de crotalária, nos experimentos com e sem chance de escolha de resposta. Essa escolha pode estar envolvida com os compostos voláteis, bem como outras características químicas e físicas das plantas. O experimento sem chance de escolha, onde a mariposa tem somente uma única espécie de planta para ovipositar, mostrou um número considerável de ovos sendo colocados nas plantas de crotalária, o que indica que apesar de não preferir, não há uma repelência da planta de crotalária às mariposas de *S. frugiperda*. A menor preferência por plantas de crotalária e o não desenvolvimento de lagartas nessa planta já foi observado anteriormente (apenas 7% de sobrevivência em condições de casa de vegetação), desfavorecendo a sua multiplicação e estabelecimento na cultura (Tavares et al., 2011; Dias et al., 2016; Viana, 2016). Assim, a crotalária pode ser usada como uma planta armadilha, como planta de bordadura, por exemplo. A crotalária não repele as mariposas, e estas ovipositam na mesma, mas a prole não consegue se desenvolver.

Esses aspectos comportamentais devem ser levados em consideração em estudos de interação inseto-planta e na escolha de qual espécie usar como planta de cobertura ou planta armadilha. Plantas do gênero *Crotalaria* são eficientes como planta de cobertura em cultivos de milho e ainda podem auxiliar no controle da principal praga do milho, podendo ser utilizada como uma ferramenta de manejo eficiente e sustentável. Entender essas interações é fundamental, e elas estão correlacionadas com os compostos químicos que cada planta libera e usa como fonte de atração ou repelência para as pragas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austin AT & Ballaré CL. Plant interactions with other organisms: molecules, ecology and evolution. **New Phytologist**, v. 204, n. 2, p. 257-260, 2014.
- Blassioli-Moraes MC, Venzon M, Silveira LCP, Gontijo LM, Togni PHB, Sujii ER, Haro MM, Borges M, Michereff MFF, Aquino MFS, Laumann RA, Caulfield J, Birkett M. Companion and Smart Plants: Scientific Background to Promote Conservation Biological Control. **Neotropical Entomology**, v. 51, n. 2, p. 171-187, 2022.
- Bouwmeester H, Schuurink RC, Bleeker PM, Schiestl F. The role of volatiles in plant communication. **The Plant Journal**, v. 100, n. 5, p. 892-907, 2019.
- Brosset A & Blande JD. Volatile-mediated plant-plant interactions: volatile organic compounds as modulators of receiver plant defence, growth, and reproduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 2, p. 511-528, 2022.
- Carroll MJ, Schmelz EA, Meagher RL, Teal PE. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 9, p. 1911-1924, 2006.
- Danner H, Boeckler GA, Irmisch S, Yuan JS, Chen F, Gershenzon J, Unsicker SB, Köllner TG. Four terpene synthases produce major compounds of the gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 9, p. 897-908, 2011.
- Das A, Lee SH, Hyun TK, Kim SW, Kim JY. Plant volatiles as method of communication. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 1, p. 9-26, 2013.
- Dias AS, Marucci RC, Mendes SM, Moreira SG, Araujo OG, Santos CA, Barbosa TA. Bioecology of *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1757) in different cover crops. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, p. 337-345, 2016.
- Dicke M. Specificity of herbivore-induced plant defences. In: Chadwick DJ & Goode JA. (Ed.). **Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence**. Novartis Foundation Symposium 223. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2007. p. 43-59.
- Dicke M & Baldwin IT. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 3, p. 167-175, 2010.
- Du YW, Shi XB, Zhao LC, Yuan GG, Zhao WW, Huang GH, Chen G. Chinese Cabbage Changes Its Release of Volatiles to Defend against *Spodoptera litura*. **Insects**, v. 13, n. 73, p. 1-14, 2022.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. Biochemistry of Plant Volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 16-32, 2013.

Gripenberg S, Mayhew PJ, Parnell M, Roslin T. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. **Ecology Letters**, v. 13, n. 3, p. 383-393, 2010.

Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

Kigathi RN, Unsicker SB, Reichelt M, Kesselmeier J, Gershenzon J, Weisser WW. Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) Under laboratory and field conditions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 11, p. 1335-1348, 2009.

Leopold EJ. Selective hydroboration of a 1,3,7-triene: homogeneraniol. **Organic Synthesis**, v. 64, p. 164-171, 1990.

McCormick AC, Unsicker SB, Gershenzon J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 5, p. 303-310, 2012.

Michereff MFF, Magalhães DM, Hassemer MJ, Laumann RA, Zhou JJ, Ribeiro PEA, Viana PA, Guimarães PEO, Schimmelpfeng PHC, Borges M, Pickett JA, Birkett MA, Blassioli-Moraes MC. Variability in herbivore-induced defence signalling across different maize genotypes impacts significantly on natural enemy foraging behaviour. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 2, p. 723-736, 2019.

NIST. Chemdata.Nist.Gov **Mass Spectrometry Data Center**. 2020. <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:downloads:start>.

Picazo-Aragonés J, Terrab A, Balao F. Plant volatile organic compounds evolution: transcriptional regulation, epigenetics and polyploidy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8956, p. 1-18, 2020.

Prada F, Stashenko EE, Martínez JR. Volatiles Emission by *Crotalaria nitens* after Insect Attack. **Molecules**, v. 26, n. 6941, p. 1-14, 2021.

Rharrabe K, Jacquin-Joly E, Marion-Poll F. Electrophysiological and behavioral responses of *Spodoptera littoralis* caterpillars to attractive and repellent plant volatiles. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 5, p. 1-9, 2014.

Schmidt FGV, Monnerat R, Borges M, Carvalho R. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos**. Circular Técnica - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 20 p.

Schweiger R, Heise AM, Persicke M, Müller C. Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 7, p. 1574-1585, 2014.

Silva DM, Bueno AF, Stecca CS, Andrade K, Neves PMOJ, Oliveira MCN. Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 4, p. 752-760, 2017.

Silva LR, Rodrigues LLB, Zaccaroni AB, Castro BS, Sifuentes DN, Botelho AS, Blassioli-Moraes MC, Mello SCM. *Sclerotium rolfsii* mycelial profile analysis by MALDI-TOF

related to biological control, volatile organic compounds diversity and onion growth promotion, as influenced by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 172, n. 104970, p. 1-14, 2022.

Tavares WS, Cruz I, Silva RB, Figueiredo MLC, Ramalho FS, Serrão JE, Zanuncio JC. Soil organisms associated to the weed suppressant *Crotalaria juncea* (Fabaceae) and its importance as a refuge for natural enemies. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 473-479, 2011.

Turlings TCJ & Erb M. Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Mechanisms, ecological relevance, and application potential. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 433-452, 2018.

Viana, G. **Crotalária reduz infestações da lagarta-do-cartucho no milho. Agroecologia e produção orgânica - Manejo Integrado de Pragas**, Embrapa, Sete Lagoas-MG, 20 dez 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18919691/crotalaria-reduce-infestacoes-da-lagarta-do-cartucho-no-milho>>.

Acesso em: 31 maio 2022.

Vincenti S, Mariani M, Alberti JC, Jacopini S, Caraffa VBB, Berti L, Maury J. Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxygenase metabolic pathway. **Catalysts**, v. 9, n. 873, p. 1-35, 2019.

von Mérey GE, Veyrat N, D'Alessandro M, Turlings TC. Herbivore-induced maize leaf volatiles affect attraction and feeding behavior of *Spodoptera littoralis* caterpillars. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 209, p. 1-9, 2013.

Wang Y, Li Y, Yang J, Ruan J, Sun C. Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 1-16, 2016.

Yactayo-Chang JP, Mendoza J, Willms SD, Rering CC, Beck JJ, Block AK. *Zea mays* volatiles that influence oviposition and feeding behaviors of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 47, n. 8, p. 799-809, 2021.

## CAPÍTULO 2

Composição química dos metabólitos secundários não voláteis de *Crotalaria spectabilis*.

### 1. INTRODUÇÃO

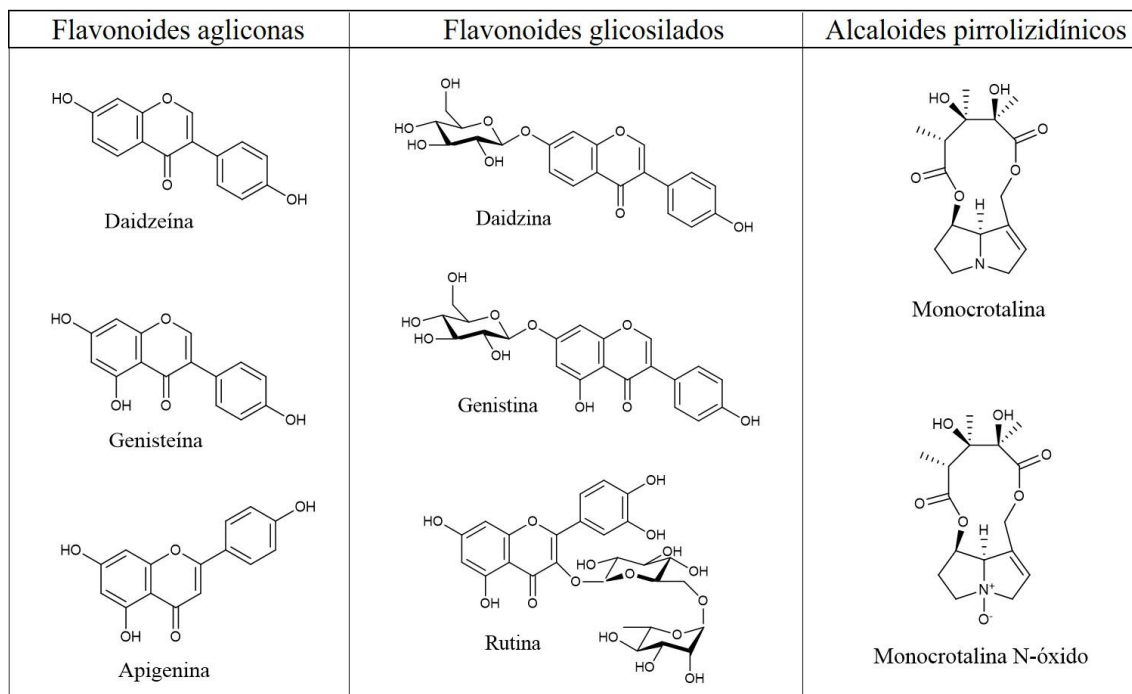
A biossíntese de metabólitos secundários não voláteis de baixo peso molecular pode estar relacionada com a defesa química das plantas contra herbívoros e patógenos (Erb & Kliebenstein, 2020). Assim como nos metabólitos secundários voláteis, os metabólitos secundários não voláteis também são biossintetizados de maneira organizada, a partir de rotas biossintéticas com intermediários chaves.

Os metabólitos secundários não voláteis envolvidos na defesa das plantas, pertencem majoritariamente às classes dos compostos fenólicos e alcaloides, possuem diversas atividades biológicas, como inseticida e antifúngica (Boulogne et al., 2012), antimicrobiana (Awouafack et al., 2011), anti-inflamatória, anticancerígena e antioxidante (Munim et al., 2003; Xie et al., 2017), e também podem apresentar elevada toxicidade a diferentes organismos como insetos, mamíferos e pássaros (Ji et al., 2005; Kopp et al., 2020).

A resistência da soja a percevejos e lagartas pode estar relacionada à concentração de flavonoides em sementes e folhas, conforme relatado por Piubelli e colaboradores (2003 e 2005), que os compostos daidzina, genistina e rutina (Figura 1) estão associados ao mecanismo de resistência de algumas cultivares de soja contra o percevejo *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae) e a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

Já as plantas do gênero *Crotalaria* sintetizam uma variedade de flavonoides e alcaloides pirrolizidínicos. Awouafack e colaboradores (2011) descreveram a atividade antimicrobiana de dois novos flavonoides encontrados em *Crotalaria lachnophora* A. Rich. (Fabales: Fabaceae), enquanto Ko e colaboradores (2004) relataram atividades anti-inflamatórias de flavonoides já conhecidos, como daidzeína e apigenina (Figura 1), isolados de *C. pallida* Aiton (Fabales: Fabaceae) e *C. assamica* Benth (Fabales: Fabaceae) destacando a importância desses compostos no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias. Atividades antioxidantes também foram descritas através de isoorientina, um flavonoide glicosilado produzido por *C. globosa* Wight & Arn (Fabales: Fabaceae) e *C. sessiliflora* L. (Fabales: Fabaceae), que foram consideradas plantas úteis na proteção do organismo humano aos danos mediados pelos radicais livres, visto que

produzem vários outros compostos com fortes atividades antioxidantes (Munim et al., 2003; Deepha et al., 2014). Recentemente, *C. spectabilis* Roth. (Fabales: Fabaceae) também foi relatada como fonte de flavonoides glicosilados e alcaloides como monocrotalina e seu respectivo N-óxido (Figura 1) (Scupinari et al., 2020).



**Figura 1.** Estrutura química de alguns flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados e alcaloides pirrolizidínicos.

Entretanto, vale ressaltar que a monocrotalina é um composto tóxico, e está presente em altas concentrações nas sementes de *Crotalaria* sp. (Munim et al., 2003; Scupinari et al., 2020; Prada et al., 2020). Portanto, mesmo sabendo que os flavonoides citados anteriormente foram encontrados principalmente nas folhas, seu uso medicinal deve ser restrito devido ao alto teor de alcaloides pirrolizidínicos nas sementes ou até mesmo sua presença em baixas concentrações nas folhas (Rech et al., 2022).

Para identificar esses compostos, a técnica mais utilizada é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM ou LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*). A alta resolução das colunas cromatográficas em uso atualmente e a alta sensibilidade do detector permitem que uma ampla gama de metabólitos com diferentes polaridades e baixa volatilidade, provenientes de extratos de plantas, sejam identificados (Wang et al., 2011; Pezzatti et al., 2020). Outra técnica que também pode ser utilizada na identificação de metabólitos secundários não voláteis de plantas é a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas





## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar duas metodologias analíticas (cromatografias líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas) na elucidação do perfil dos metabólitos secundários não voláteis de diferentes partes da planta *C. spectabilis*, visando aplicações em estudos de Ecologia Química.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

- Extrair os compostos não voláteis de raízes, folhas e sementes de *C. spectabilis*;
- Identificar e quantificar por cromatografia líquida e espectrometria de massas os principais metabólitos secundários não voláteis de raízes, folhas e sementes de *C. spectabilis*;
- Identificar e quantificar por cromatografia gasosa e espectrometria de massas os principais metabólitos secundários não voláteis de raízes, folhas e sementes de *C. spectabilis*;
- Explorar e discutir vantagens e desvantagens das diferentes técnicas utilizadas para as análises quantitativas e qualitativas dos metabólitos secundários não voláteis de *C. spectabilis*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Semioquímicos (LSE) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF, Brasil, e no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis (LQB), da Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, Brasil.

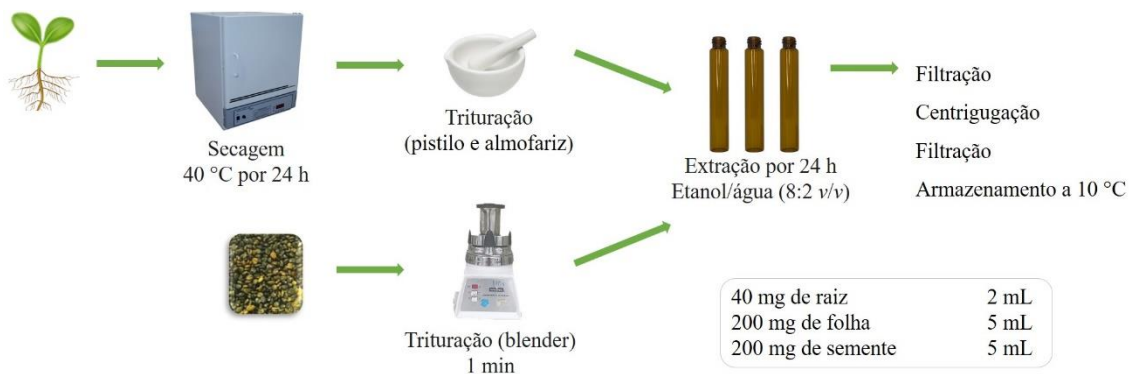
#### 3.2 Cultivo de plantas

As sementes de *C. spectabilis* foram obtidas da Sementes Caiçara LTDA, sediada em Brejo Alegre - SP, e foram germinadas em papel úmido por dois dias. A semeadura foi feita em vasos de plástico de 10 cm de altura, com diâmetro de 12 cm na parte superior e 9 cm na parte inferior, preenchidos com uma mistura de solo autoclavado e substrato orgânico (Maxfertil Substratos, Pouso Redondo - SC) na proporção de 1:1. Em cada vaso foram depositadas cinco sementes, e sete dias após a semeadura foi realizado um desbaste, deixando apenas três plantas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e as plantas foram irrigadas a cada dois dias.

#### 3.3 Extração de compostos

Para a extração dos compostos não voláteis de raízes e de folhas de *C. spectabilis*, foram usadas plantas com 45 dias após a germinação, no estágio vegetativo. As raízes e as folhas foram previamente secas em estufa a 40 °C durante 24 h, e em seguida foram separadamente trituradas utilizando um pistilo e almofariz, até virar pó (Esquema 2). As sementes foram trituradas até obter um pó fino utilizando um blender (31BL41, Waring Commercial). Para a extração dos compostos, aproximadamente 40 mg de raízes, 200 mg de folhas e 200 mg de sementes em pó foram colocados em frascos de vidro âmbar de 15 mL, e na sequência foi adicionado respectivamente 2,0, 5,0 e 5,0 mL do solvente de extração (etanol/água 8:2) em cada frasco correspondente às raízes, folhas e sementes. A extração foi realizada à temperatura ambiente e sem agitação durante 24 h, conforme metodologia descrita por Scupinari e colaboradores (2020). Passadas as 24 h, os extratos hidroetanólicos foram filtrados em papel filtro com poros de 14 µm (J. Prolab), centrifugados a 4500 rcf por 5 min (microcentrífuga EBA 12, Hettich Zentrifugen), e o sobrenadante foi separado e filtrado em filtro milipore PTFE (4 mm de diâmetro com poros de 0,45 µm; Millex). Os extratos obtidos foram armazenados em geladeira a 10 °C

para posteriores análises químicas. Foram realizadas dez replicatas para cada parte da planta avaliada. As amostras de raízes, folhas e sementes estavam nas concentrações de aproximadamente 20, 40 e 40 mg de material vegetal/mL, respectivamente (considerando a massa do pó triturado e o volume de solvente utilizado para a extração).



**Esquema 2.** Metodologia utilizada para extração dos compostos não voláteis de raízes, folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis*.

### 3.4 Análises químicas dos extratos hidroetanólicos

#### 3.4.1 Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por HPLC-UV

Para avaliar a qualidade dos extratos obtidos, que seriam posteriormente analisados por LC-MS, todos os extratos obtidos foram previamente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) com detector de ultravioleta (UV) de arranjo de fotodiodos (PDA, do inglês *photodiode array*). Uma alíquota de 10 µL de cada extrato obtido de raízes, folhas e sementes foi analisada em HPLC (Flexar, Perkin Elmer, EUA), equipado com uma bomba quaternária. Uma coluna C18 (ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 mm de diâmetro x 250 mm de comprimento, partículas de 5 µm; Agilent, EUA) foi utilizada como fase estacionária, enquanto os solventes da fase móvel foram água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido trifluoroacético. O gradiente utilizado consistiu de 10% B por 5 min, seguido de 10 a 30% B em 45 min, um segundo gradiente de 30 a 95% B em 1 min, mantendo-se por 5 min, seguido de um terceiro gradiente de 95 a 10% B em 1 min, voltando às condições iniciais. O tempo total da corrida foi de 65 min, o fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e a temperatura do forno foi mantida a 25 °C. Os solventes utilizados foram de grau HPLC. Foi utilizado um detector espectrofotométrico com lâmpada de tungstênio, monitorando os comprimentos de onda 228, 260 e 280 nm.

### 3.4.2 Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por UHPLC-HRMS

Para identificar os compostos presentes nos extratos de raízes, folhas e sementes, amostras previamente selecionadas pela análise de HPLC com detector UV foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry*). Para isto, uma alíquota de 0,5 µL de cada extrato obtido de raízes, folhas e sementes foi injetado no sistema Nexera X2 UHPLC (Shimadzu Corporation, Japão), equipado com uma coluna C18 de fase reversa (Acquity UPLC HSS T3 2,1 mm de diâmetro x 150 mm de comprimento, partículas de 1,8 µm; Waters Technologies, Irlanda), mantida a 40 °C. Para a fase móvel, foram utilizados os solventes água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. Os parâmetros da corrida cromatográfica foram: proporção inicial de 5% de B, gradiente linear até 55% de B em 15 min, gradiente linear até 100% de B em 3 min, isocrático com 100% de B por 2 min, e reequilíbrio nas condições iniciais (5% de B) por 5 min (tempo total de análise de 25 min). A vazão da fase móvel foi fixada em 400 µL/min. Foi analisada uma replicata de cada parte da planta avaliada, e as amostras ficaram armazenadas por cerca de doze meses após a extração, até serem analisadas.

Os cromatogramas foram adquiridos utilizando espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS) modelo maXis 4G q-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha) usando fonte de *electrospray* nos modos de íon positivo e negativo, (ESI(+)-MS e ESI(-)-MS), utilizando a ferramenta Auto-MS para obtenção de espectros MS<sup>2</sup>. As configurações do instrumento MS utilizadas foram: deslocamento da placa terminal, 500 V; tensão capilar, 3800 V; pressão do nebulizador, 4 bar; fluxo de gás nitrogênio, 9 L/min e temperatura igual a 200 °C. A taxa de espectro de aquisição foi de 3,00 Hz, monitorando uma faixa de massa de 70 a 1200 m/z. A solução de formato de sódio (solução de NaOH 10 mM em isopropanol/água 50:50 contendo 0,2% de ácido fórmico) foi injetada diretamente através de uma válvula de 6 portas no início de cada corrida cromatográfica para calibração interna das massas.

O sistema UHPLC-HRMS/MS foi operado utilizando o pacote Compass 1.7 (Bruker Daltonics, Alemanha), composto pelos *softwares* otofControl 3.4 e HyStar 3.2. Os dados brutos foram processados utilizando o *software* DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), e tratados com o algoritmo *Dissect*, em que é criada uma lista de compostos com a média dos espectros de massas de primeira e segunda ordem para cada composto, tornando possível diferenciar picos sobrepostos.

### 3.4.3 Análises dos espectros por UHPLC-HRMS

Para avaliar os espectros de primeira ordem (MS), foram utilizadas as ferramentas SmartFormula e CompoundCrawler, constituintes do *software* DataAnalysis. O SmartFormula utiliza o valor medido de massa/carga ( $m/z$ ) para calcular possíveis fórmulas moleculares, que são ordenadas em valores de erro em ppm – baseados na diferença entre a massa medida e a massa calculada –, e de mSigma – baseado na diferença entre o padrão de distribuição isotópica medido e o teórico. Subsequentemente ao SmartFormula, foi utilizado o CompoundCrawler, que realiza buscas das fórmulas candidatas em bancos de dados disponíveis online, tais como PubChem e KEGG.

Para avaliar os espectros de segunda ordem (MS/MS), foi utilizada a ferramenta MetFrag (Ruttkies et al., 2016), um *software* de acesso aberto baseado na web (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta>) para anotação de espectros de massas em tandem de alta resolução. A identificação das estruturas químicas dos compostos nas amostras foi realizada através de um algoritmo de comparação dos valores de massa/carga obtidos nos espectros analisados com moléculas candidatas fragmentadas *in silico* de diferentes bancos de dados, tais como PubChem e KEGG. Desta forma, foi calculada uma pontuação (escore) usando as correspondências de pico de fragmento, fornecendo informações sobre a qualidade da atribuição do espectro candidato.

As estruturas sugeridas de forma putativa por meio da avaliação dos espectros de primeira e segunda ordem foram compiladas em tabelas, e quando possível, comparadas com dados da literatura científica (Tabelas 1, 2 e 3).

### 3.4.4 Análises quantitativas dos extratos hidroetanólicos por UPLC-PDA-ELSD

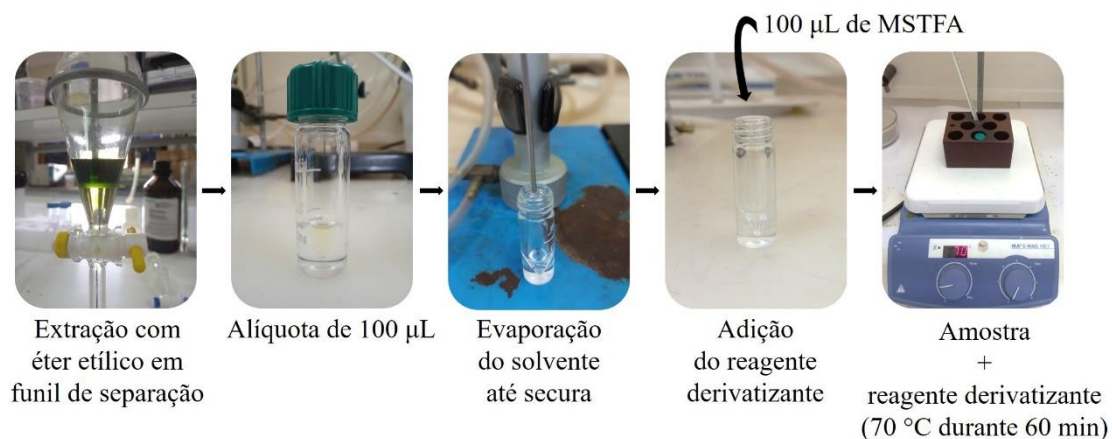
As análises quantitativas foram feitas através das curvas de calibração dos compostos sintéticos disponíveis, nas concentrações entre 0,00025 e 0,01 mg/mL para os flavonoides, e entre 0,1 e 4,0 mg/mL para a monocrotalina. As amostras e os padrões das curvas de calibração foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada ao detector UV-Vis de arranjo de fotodiodos (PDA) e detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD, do inglês *evaporative light scattering detector*) (UPLC-PDA-ELSD). O sistema UPLC Acquity H-Class (Waters Technologies, EUA) foi equipado com uma coluna C18 de fase reversa (Acquity UPLC HSS T3 2,1 mm de diâmetro x 150 mm de comprimento, partículas de 1,8  $\mu\text{m}$ ; Waters Technologies, Irlanda), mantida a 40 °C. Para a fase móvel, foram utilizados os solventes água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido trifluoroacético. Os parâmetros

da corrida cromatográfica foram: proporção inicial de 5% de B, gradiente linear até 55% de B em 15 min, gradiente linear até 100% de B em 3 min, isocrático com 100% de B por 2 min, e reequilíbrio nas condições iniciais (5% de B) por 5 min (tempo total de análise de 25 min). A vazão da fase móvel foi fixada em 400 µL/min e o volume de injeção igual a 1 µL. O sistema UPLC-PDA-ELSD foi operado utilizando o *software* Empower 3 (Waters Technologies).

As configurações utilizadas no detector PDA foram: range de aquisição de 210 a 400 nm, resolução de 1,2 nm, taxa de aquisição em 20 pontos/segundo, e os canais de aquisição foram fixos em 248 nm para a daidzeína, 260 nm para a genisteína e 290 nm para a naringenina, pois eram os comprimentos de onda de máxima absorção para cada um desses compostos (os espectros UV desses compostos podem ser consultados no Apêndice III). As configurações do detector ELSD foram: nebulizador no modo *cooling*, pressão de nitrogênio a 40 psi e temperatura do *drift tube* a 50 °C.

### 3.5 Derivatização

Para possibilitar as análises dos compostos não voláteis em cromatografia gasosa, as amostras dos extratos hidroetanólicos foram derivatizadas utilizando o reagente N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) com o objetivo de aumentar a volatilidade dos compostos. Para isso, uma alíquota de 1 mL dos extratos hidroetanólicos de raízes, de folhas e de sementes foram previamente submetidos a uma extração de 3x com 1 mL de éter etílico, para eliminar açúcares e outras moléculas com alta polaridade. Análises prévias mostraram a presença significativa de açúcares, o que estava suprimindo e coelindo com compostos minoritários de interesse. Após a extração, as fases orgânicas em éter etílico foram combinadas, foi adicionada uma pequena quantidade de MgSO<sub>4</sub> para eliminar possíveis resquícios de água, e em seguida, as fases orgânicas em éter etílico foram concentradas sob fluxo de nitrogênio para 300 µL. Em seguida, uma alíquota de 100 µL de cada extrato foi adicionada separadamente em frascos de 2 mL de vidro de fundo cônico, o solvente foi evaporado até a *secura* sob fluxo de nitrogênio, e 100 µL do reagente de derivatização MSTFA foi adicionado. A mistura amostra + agente derivatizante foi deixada reagir sem agitação, a 70 °C em placa de aquecimento (C-MAG HS 7, IKA) durante 60 min (Esquema 3) (Borges et al., 2006). Foram derivatizadas seis replicatas para cada parte da planta avaliada. Após a derivatização, as amostras foram conduzidas às análises químicas.



**Esquema 3.** Metodologia utilizada para derivatização (imagens pessoais).

### 3.6 Análises químicas dos extratos derivatizados por GC-FID e GC-MS

Para as análises quantitativas dos compostos derivatizados, cada amostra foi acrescida de 1 µL do padrão interno (PI) ácido gálico 1,0 mg/mL, preparado em etanol. Posteriormente, as amostras com PI foram derivatizadas conforme metodologia descrita em 3.5 e uma alíquota de 1 µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC ou GC-FID, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*) (Agilent 7890A, EUA). Os compostos foram quantificados em mg de composto/g de material vegetal.

O GC-FID estava equipado com uma coluna capilar apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25 µm; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). As amostras foram analisadas usando um programa com gradiente de temperatura, iniciando a 60 °C por 2 min, aumentando gradualmente 5 °C/min até atingir 180 °C, seguido de um segundo gradiente de 3 °C/min até atingir 280 °C, que foi mantido por 10 min. Temperatura do injetor a 250 °C, e do detector a 270 °C, usando o modo *splitless* e tendo o hélio como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min. A quantificação dos compostos produzidos pela planta foi realizada através da comparação das áreas de cada composto com a área do padrão interno utilizado, considerando-se o fator de resposta do detector para todos os compostos igual a 1,0. Os dados foram coletados e analisados com o *software* GC OpenLab CDS ChemStation (Agilent, EUA) e tabulados com o programa Excel (Microsoft Office 2019, Microsoft Corporation, EUA).

Para as análises qualitativas, uma alíquota de 1 µL de amostras previamente selecionadas foram injetadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS) (Agilent 5975 MSD, China), equipado com um analisador quadrupolar

e coluna capilar apolar DB-5MS (0,25 mm de diâmetro x 30 m de comprimento e filme de 0,25 µm; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), fonte de ionização por impacto de elétrons (70 eV, à temperatura de 200 °C), temperatura do injetor a 250 °C, usando o modo *splitless*, interface a 280 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. O mesmo programa de temperatura descrito anteriormente foi utilizado. Os dados foram coletados e analisados com o *software* MassHunter Workstation 10.1.49 (Agilent, EUA). Os compostos foram identificados na forma derivatizada através da comparação do padrão de fragmentação com os dados catalogados em bibliotecas espectrais (NIST, 2020), pelo cálculo do índice de retenção (IR), e checados quando possível com padrões autênticos também na forma derivatizada, na concentração de 0,02 mg/mL.

Para o cálculo do IR, uma mistura de padrões de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>) 0,01 mg/mL foi injetada nas mesmas condições anteriormente descritas, para comparação de resultados com dados da literatura, da mesma forma como descrito no capítulo 1, para os compostos voláteis.

### 3.7 Análises estatísticas

Os dados de quantidade total de compostos não voláteis derivatizados de cada classe química (ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, flavonoides e alcaloides pirrolizidínicos) de raízes, folhas e sementes foram avaliados para o requisito de normalidade utilizando teste de Shapiro-Wilk, e quando os dados não tiveram normalidade, foi aplicado o log. Na sequência, para avaliar se havia diferença na quantidade total de compostos não voláteis, foi aplicada análise de variância (Anova) e teste de Tukey, através do *software* estatístico R (Foundation for Statistical Computing, versão 4.1.1) usando o pacote *carData*.

Para diferenciar os tratamentos e procurar as similaridades a partir do perfil dos compostos não voláteis derivatizados das raízes, folhas e sementes, foram realizadas análises multivariadas de componentes principais (ACP ou PCA, do inglês *principal component analysis*), usando a matriz de variância-covariância. Esta análise fornece uma representação gráfica dos compostos que mais contribuem para os níveis de agrupamento dos tratamentos. A PCA foi realizada utilizando o *software* Past (Paleontological Statistics, versão 4.04) (Hammer et al., 2001).



### 3.8 Origem dos compostos

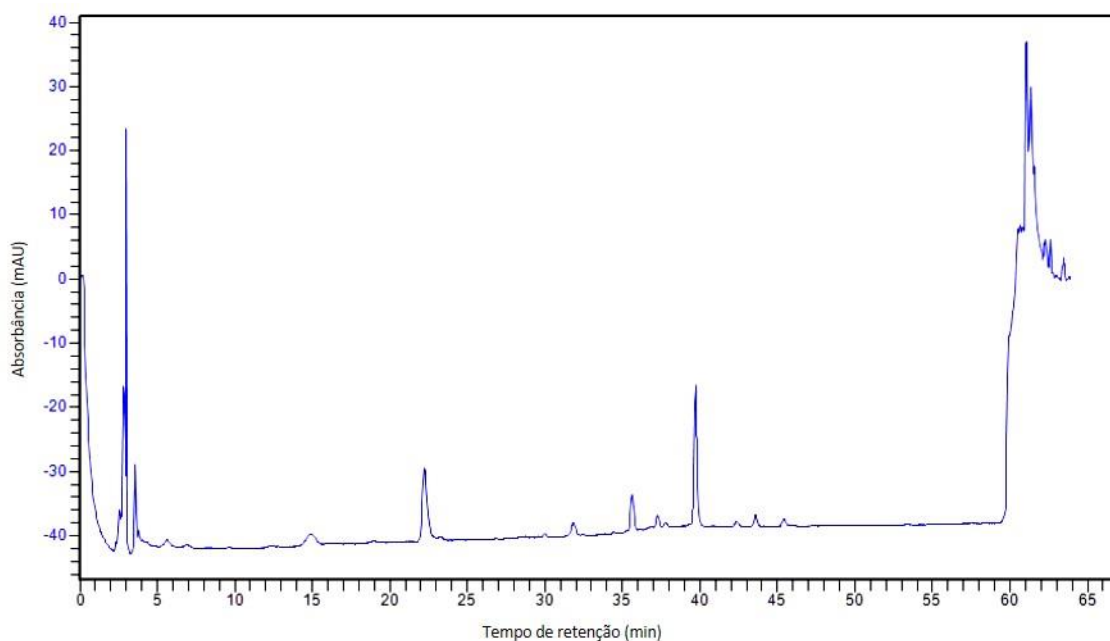
Os compostos químicos ácido palmítico (99%), ácido oleico (99%), ácido esteárico (99,5%), ácido nonanoico (96%), ácido benzoico (99,5%), ácido *p*-hidroxibenzoico (99%), ácido cafeico (98%), ácido vanílico (97%), ácido gálico (97,5%), ácido *p*-cumárico (98%), naringenina (95%), MSTFA (98,5%), ácido trifluoroacético (99%) e ácido fórmico (98%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O composto ácido decanoico (98%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O composto monocrotalina (98%) foi obtido da Sigma-Aldrich (China). Os compostos ácido linoleico, daidzeína, genisteína e quercetina (95%) foram obtidos da Cayman Chemical Company (Michigan, EUA). O ácido heptadecanoico (97%) foi obtido da Proton Research. Os solventes álcool etílico (99,7%) e acetonitrila (99,98%) foram obtidos da JT Baker (Cidade do México, México), e o éter etílico (99,8%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e re-destilado antes do uso.

## 4. RESULTADOS

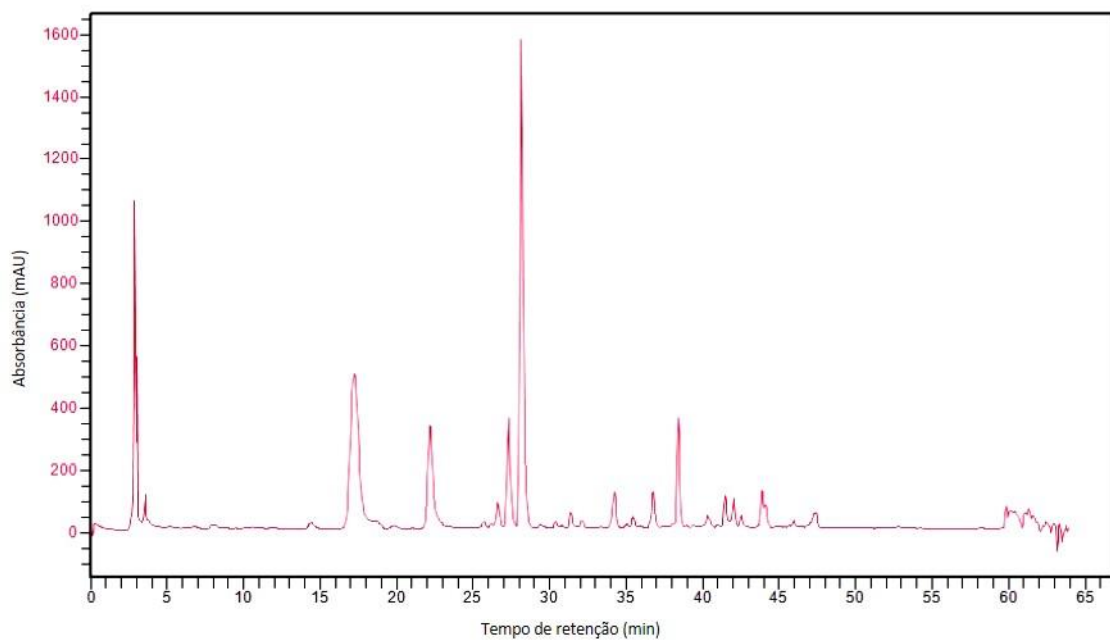
### 4.1 Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por HPLC-UV

A partir das análises dos extratos hidroetanólicos por HPLC-UV, foi possível obter o perfil cromatográfico de cada parte da planta avaliada. O método utilizado apresentou uma separação eficiente dos compostos. O extrato de raízes apresentou um perfil cromatográfico com menor número de picos (Figura 2) comparado com o perfil cromatográfico obtido para os extratos de folhas e de sementes (Figuras 3 e 4). O extrato de sementes apresentou um perfil cromatográfico com uma maior quantidade de picos (Figura 4).

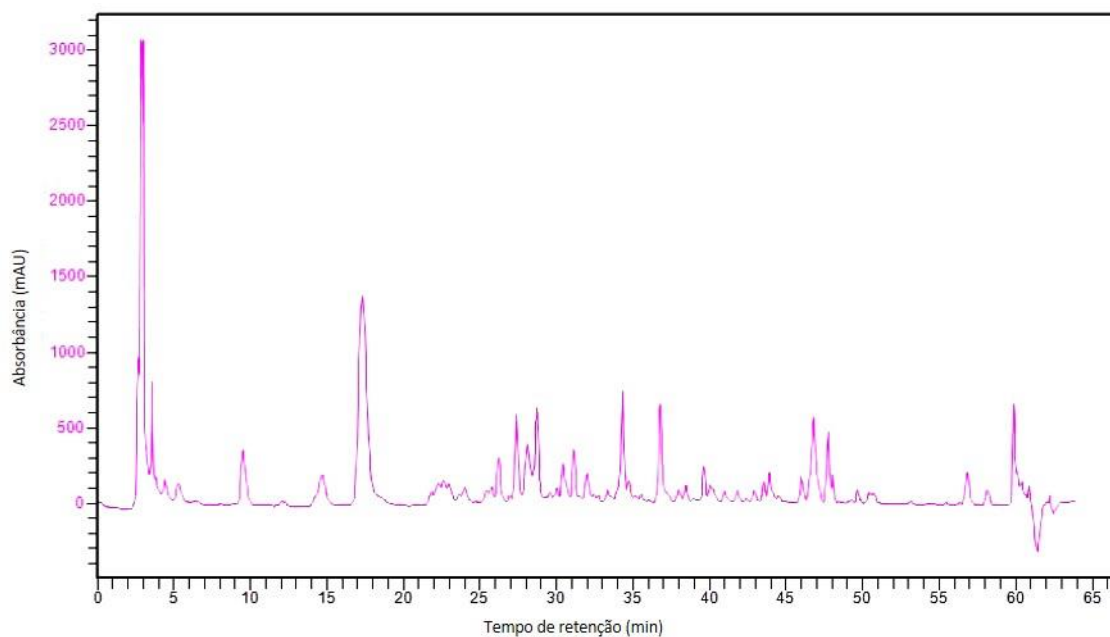
Foram injetadas oito replicatas de cada parte da planta, e todas as replicatas apresentaram repetibilidade no perfil cromatográfico. Desta forma, foi possível selecionar uma amostra representativa de cada parte da planta, para posteriormente conduzir as análises por UHPLC-HRMS.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico obtido na análise de HPLC-UV do extrato de raízes de *Crotalaria spectabilis*, no comprimento de onda 260 nm.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico obtido na análise de HPLC-UV do extrato de folhas de *Crotalaria spectabilis*, no comprimento de onda 260 nm.



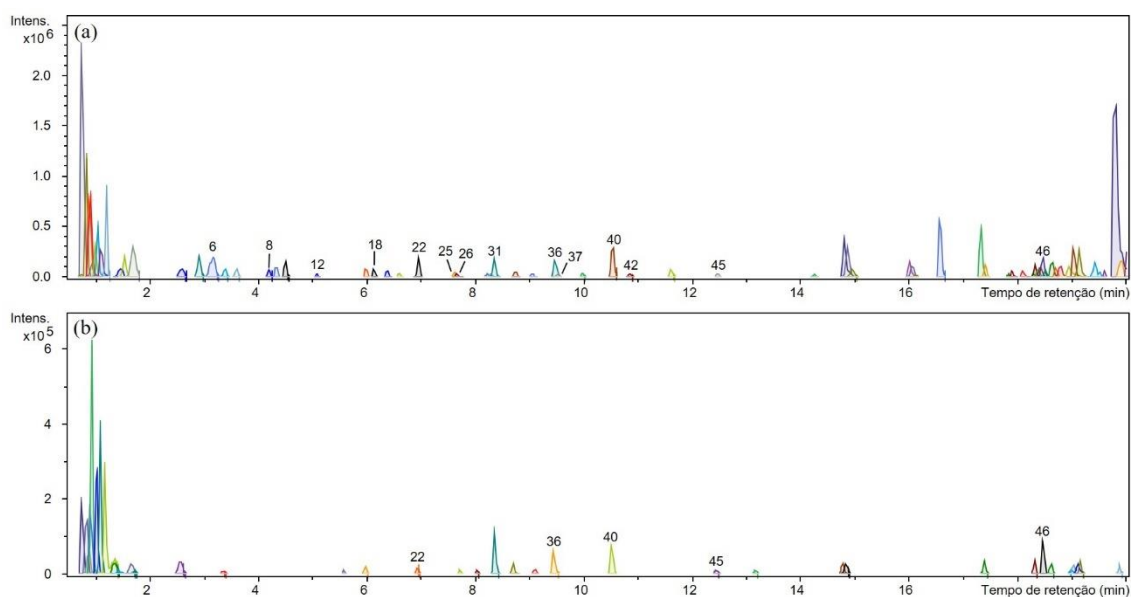
**Figura 4.** Perfil cromatográfico obtido na análise de HPLC-UV do extrato de sementes de *Crotalaria spectabilis*, no comprimento de onda 260 nm.

#### 4.2 Análises qualitativas dos extratos hidroetanólicos por UHPLC-HRMS

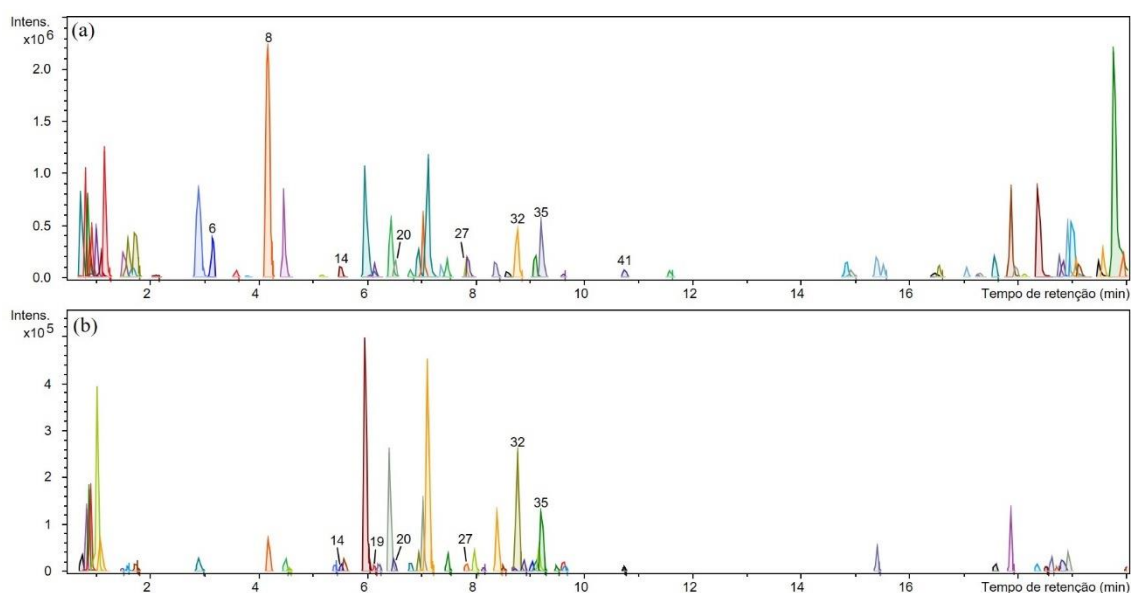
Os dados dos extratos hidroetanólicos analisados por UHPLC-HRMS foram tratados com o algoritmo *Dissect*, que criou uma lista de compostos com a média dos espectros de massas de primeira e de segunda ordens. No modo positivo de aquisição dos íons foi possível detectar 68 picos nas raízes (Figura 5a e Tabela 1), 63 nas folhas (Figura 6a e Tabela 2) e 77 nas sementes (Figura 7a e Tabela 3) de *C. spectabilis*. Já no modo negativo, um número menor de picos foi detectado, com 39 nas raízes (Figura 5b e Tabela 1), 52 nas folhas (Figura 6b e Tabela 2) e 55 nas sementes (Figura 7b e Tabela 3). Os números dos picos em cada um dos cromatogramas são correspondentes aos números das Tabelas 1, 2 e 3. Os picos que estão presentes nos cromatogramas, mas não têm numeração e não aparecem nas tabelas, não foram identificados por não obterem êxito ao terem seus espectros comparados com espectros de moléculas candidatas fragmentadas *in silico* de diferentes bancos de dados disponíveis.

Os compostos monocrotalina, daidzeína, genisteína, naringenina e ácido *p*-cumárico foram confirmados com padrões autênticos, e por isso obtiveram nível de confiança igual a 1, de acordo com a definição dos níveis de confiança para a identificação de um composto, proposta pela *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), que pode ser consultada no Anexo I (Blazenovic et al., 2018).

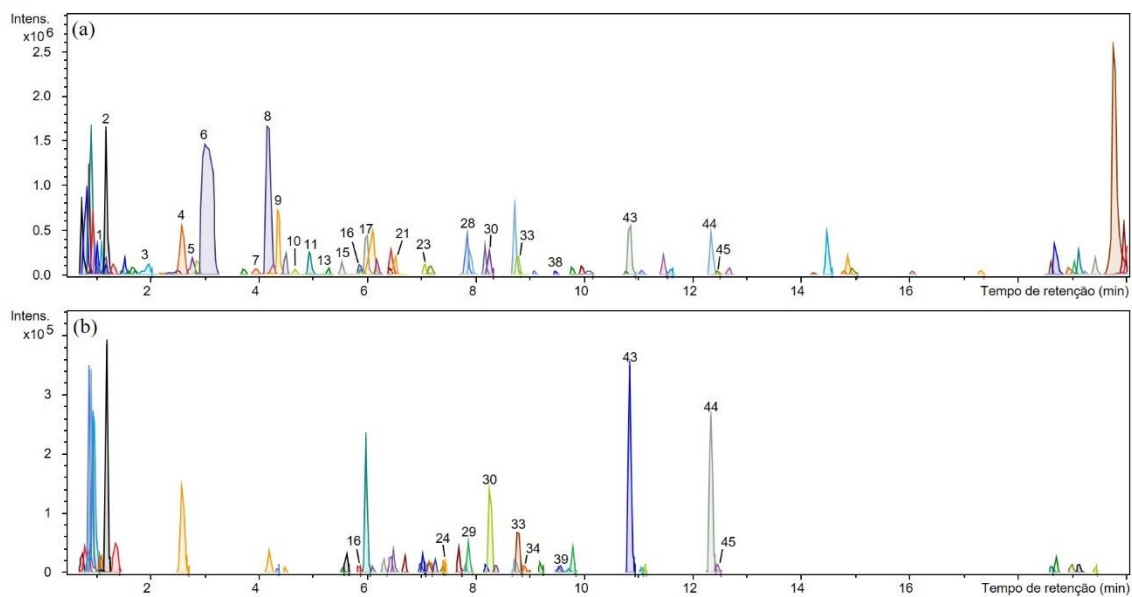
A análise no modo de íon positivo permitiu a identificação dos alcaloides pirrolizidínicos monocrotalina e monocrotalina N-óxido nas três partes analisadas da planta, 14-hidroxi monocrotalina, 14-metilmonocrotalina, retusina, crotaleschenina, crispatina e integerrimina nas sementes; dos flavonoides genisteína nas raízes e sementes, apigenina, daidzeína e prunetina nas raízes, e naringenina nas sementes; e dos flavonoides glicosilados isovitexina nas raízes, quercetina glicosilada nas folhas, rutina e isoorientina nas sementes. Já a análise no modo de íon negativo permitiu a identificação dos flavonoides genisteína nas raízes e nas sementes, apigenina e daidzeína nas raízes, e naringenina nas sementes; dos flavonoides glicosilados quercetina glicosilada nas folhas e isoorientina nas sementes; e do ácido fenólico ácido *p*-cumárico nas sementes. Nenhum alcaloide pirrolizidínico foi detectado no modo de íon negativo.



**Figura 5.** Perfil cromatográfico de íons totais obtido na análise de UHPLC-HRMS do extrato hidroetanólico de raízes de *Crotalaria spectabilis*, após o uso do algoritmo *Dissect*, analisados nos modos de íon (a) positivo e (b) negativo. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 1.



**Figura 6.** Perfil cromatográfico de íons totais obtido na análise de UHPLC-HRMS do extrato hidroetanólico de folhas de *Crotalaria spectabilis*, após o uso do algoritmo *Dissect*, analisados nos modos de íon (a) positivo e (b) negativo. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 2.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico de íons totais obtido na análise de UHPLC-HRMS do extrato hidroetanólico de sementes de *Crotalaria spectabilis*, após o uso do algoritmo *Dissect*, analisados nos modos de íon **(a)** positivo e **(b)** negativo. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 3.

**Tabela 1.** Dados cromatográficos e de espectrometria de massas dos compostos identificados na análise do extrato hidroetanólico de raízes de *Crotalaria spectabilis*, por UHPLC-HRMS/MS, nos modos de íon positivo e negativo. O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado no cromatograma da Figura 5.

Nº	T.R. (min)	Íon precursor (m/z)	Fórmula molecular neutra	Erro (ppm)	Composto	Fragmentações MS/MS (m/z)	Classe química	N.C.	Referência
Modo Positivo									
6	3.20	326.1597	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	0.0	Monocrotalina	94.0646, 120.0802, 121.0879, 138.0909, 164.1064, 194.1166, 237.1353, 238.1412, 280.1538, 298.1643	Alcaloide pirrolizidínico	1	Scupinari et al., 2020; Zhang et al., 2017; Prada et al., 2020.
8	4.23	342.1545	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	0.7	Monocrotalina N-óxido	94.0651, 119.0725, 120.0795, 136.0754, 137.0827, 138.0886, 236.1276, 296.1484	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020; Scupinari et al., 2020.
12	5.11	579.1723	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-2.6	Flavonoide glicosilado N.I.	255.0649, 256.0684, 297.0749, 417.1185	Flavonoide glicosilado	3	-
18	6.16	433.1141	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	-3.3	Isovitexina	137.0228, 201.0539, 215.0690, 239.0695, 271.0597, 272.0628, 273.0648	Flavonoide glicosilado	2	Yoo et al., 2004; Tang et al., 2017; Xie et al., 2017.
22	6.98	417.1189	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	-2.4	Flavonoide glicosilado N.I.	137.0224, 199.0745, 227.0692, 255.0646, 256.0679, 257.0707	Flavonoide glicosilado	3	-
25	7.63	519.1139	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	-1.0	Flavonoide glicosilado N.I.	137.0228, 201.0543, 271.0595, 272.0628	Flavonoide glicosilado	3	-
26	7.68	417.1184	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	-0.8	Flavonoide glicosilado N.I.	199.0748, 255.0644, 256.0687, 297.0744	Flavonoide glicosilado	3	-
31	8.38	503.1195	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	-2.5	Flavonoide glicosilado N.I.	199.0744, 227.0700, 255.0647, 256.0681, 257.0702	Flavonoide glicosilado	3	-
36	9.49	271.0598	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.5	Apigenina	137.0227, 173.0593, 197.0589, 201.0540, 202.0571, 215.0695, 243.0637, 253.0482	Flavonoide	2	Ko et al., 2004; Renier et al., 2008; Sinan et al., 2020.
37	9.55	519.1134	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	-0.5	Flavonoide glicosilado N.I.	271.0591, 272.0628	Flavonoide glicosilado	3	-
40	10.56	255.0650	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	1.3	Daidzeína	137.0227, 153.0691, 181.0643, 199.0748, 200.0779, 227.0694, 237.0539	Flavonoide	1	Ko et al., 2004.
42	10.87	285.0753	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	2.3	Prunetina	137.0226, 197.0586, 213.0535, 225.0533, 253.0478, 269.0447, 270.0513, 271.0550	Flavonoide	2	Awouafack et al., 2011; Beszterda et al., 2020.

45	12.49	271.0597	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.1	Genisteína	149.0228, 153.0176, 197.0594, 215.0694, 243.0645	Flavonoide	1	Elgindi et al., 2009.
46	18.47	323.1274	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	1.2	Flavonoide N.I.	123.0435, 171.0798, 185.0952, 187.0748, 199.0733, 200.0822, 201.0897, 213.0898	Flavonoide	3	-
Modo Negativo									
22	6.94	415.1026	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	2.2	Flavonoide glicosilado N.I.	252.0418, 253.0497, 254.0524	Flavonoide glicosilado	3	-
36	9.48	269.0449	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.1	Apigenina	91.0181, 135.0082, 197.0597, 199.0387, 225.0547, 241.0495	Flavonoide	2	Ko et al., 2004; Renier et al., 2008; Sinan et al., 2020.
40	10.54	253.0500	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	2.4	Daidzeína	91.0183, 133.0288, 135.0081, 197.0598, 209.0600, 224.0465, 225.0547	Flavonoide	1	Ko et al., 2004.
45	12.45	269.0446	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1.3	Genisteína	133.0286	Flavonoide	1	Elgindi et al., 2009.
46	18.47	321.1125	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2.4	Flavonoide N.I.	91.0544, 109.0288, 135.0447, 173.0601, 199.0760	Flavonoide	3	-

T.R.: Tempo de retenção.

N.C.: Nível de confiança (a descrição dos níveis de confiança pode ser consultada no Anexo I).

N.I.: Não identificado.

**Tabela 2.** Dados cromatográficos e de espectrometria de massas dos compostos identificados na análise do extrato hidroetanólico de folhas de *Crotalaria spectabilis*, por UHPLC-HRMS/MS, nos modos de íon positivo e negativo. O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado no cromatograma da Figura 6.

Nº	T.R. (min)	Íon precursor (m/z)	Fórmula molecular neutra	Erro (ppm)	Composto	Fragmentações MS/MS (m/z)	Classe química	N.C.	Referência
Modo Positivo									
6	3.19	326.1611	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	-4.0	Monocrotalina	94.0649, 95.0726, 120.0807, 121.0883, 138.0913, 164.1069, 194.1178, 237.1362, 238.1421, 280.1549, 298.1652	Alcaloide pirrolizidínico	1	Scupinari et al., 2020; Zhang et al., 2017; Prada et al., 2020.
8	4.21	342.1575	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	-8.8	Monocrotalina N-óxido	94.0650, 118.0651, 119.0729, 120.0805, 136.0758, 137.0836, 138.0893, 154.0863, 236.1287, 253.1315, 296.1498	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020; Scupinari et al., 2020.



14	5.55	597.1482	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	-5.9	Quercetina 3-O-[beta-D-xilosil-(1->2)-beta-D-glucosídeo]	303.0505, 304.0533, 305.0550, 465.1044, 466.1080	Flavonoide glicosilado	3	-
20	6.55	595.1689	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-5.2	Flavonoide glicosilado N.I.	85.0283, 287.0558, 288.0584, 289.0610, 449.1098, 450.1133	Flavonoide glicosilado	3	-
27	7.86	759.1817	C <sub>35</sub> H <sub>34</sub> O <sub>19</sub>	-6.7	Flavonoide glicosilado N.I.	97.0282, 115.0387, 163.0392, 217.0498, 277.0711, 295.0814, 303.0503, 465.1042	Flavonoide glicosilado	3	-
32	8.79	449.1093	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-3.3	Quercetina-O-desoxihexosídeo	129.0544, 147.0649, 303.0510, 304.0539, 305.0559	Flavonoide glicosilado	2	Scupinari et al., 2020.
35	9.24	757.2022	C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	-6.4	Flavonoide glicosilado N.I.	109.0282, 119.0488, 147.0444, 148.0475, 165.0547, 291.0871, 303.0504, 309.0979, 419.1354	Flavonoide glicosilado	3	-
41	10.76	757.2010	C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	-4.5	Flavonoide glicosilado N.I.	147.0443, 148.0476, 291.0858, 303.0501, 304.0530, 309.0980	Flavonoide glicosilado	3	-
Modo Negativo									
14	5.55	595.1318	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	-2.0	Quercetina 3-O-[beta-D-xilosil-(1->2)-beta-D-glucosídeo]	299.0201, 301.0346, 462.0806, 463.0873	Flavonoide glicosilado	3	-
19	6.16	771.2002	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	-1.9	Flavonoide glicosilado N.I.	301.0351, 462.0816, 463.0892	Flavonoide glicosilado	3	-
20	6.54	593.1524	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-2.2	Flavonoide glicosilado N.I.	283.0245, 285.0405, 446.0856	Flavonoide glicosilado	3	-
27	7.84	757.1626	C <sub>35</sub> H <sub>34</sub> O <sub>19</sub>	0.1	Flavonoide glicosilado N.I.	301.0351, 463.0885, 464.0919, 595.1109	Flavonoide glicosilado	3	-
32	8.80	447.0932	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	0.0	Quercetina-O-desoxihexosídeo	151.0034, 178.9983, 255.0291, 271.0242, 272.0285, 300.0270, 301.0338, 302.0370	Flavonoide glicosilado	2	Scupinari et al., 2020.
35	9.25	755.1819	C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	1.1	Flavonoide glicosilado N.I.	178.9980, 300.0269, 301.0346, 609.1459, 610.1496	Flavonoide glicosilado	3	-

T.R.: Tempo de retenção.

N.C.: Nível de confiança (a descrição dos níveis de confiança pode ser consultada no Anexo I).

N.I.: Não identificado.

**Tabela 3.** Dados cromatográficos e de espectrometria de massas dos compostos identificados na análise do extrato hidroetanólico de sementes de *Crotalaria spectabilis*, por UHPLC-HRMS/MS, nos modos de íon positivo e negativo. O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado no cromatograma da Figura 7.

Nº	T.R. (min)	Íon precursor (m/z)	Fórmula molecular neutra	Erro (ppm)	Composto	Fragmentações MS/MS (m/z)	Classe química	N.C.	Referência
Modo Positivo									
1	1.11	156.1019	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	-0.1	Heliotridina	87.0438, 98.9837, 110.0336, 110.0957, 120.0803, 135.0298, 138.0912, 153.0409	Alcaloide	3	-
2	1.23	342.1553	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	-1.9	14-Hidroximonocrotalina	94.0651, 120.0805, 121.0876, 132.1016, 138.0913, 140.1059, 210.1126, 228.1233, 253.1300, 296.1480, 324.1444	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020.
3	2.01	342.1549	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	-1.0	Alcaloide pirrolizidínico N.I.	94.0647, 120.0804, 121.0880, 138.0912, 140.1066, 210.1125, 228.1230, 253.1304, 296.1490, 324.1442	Alcaloide pirrolizidínico	3	-
4	2.62	326.1616	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	-4.5	Alcaloide pirrolizidínico N.I.	94.0650, 120.0808, 121.0884, 138.0912, 194.1177, 210.1122, 228.1223, 237.1362	Alcaloide pirrolizidínico	3	-
5	2.82	340.1759	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	-1.1	Alcaloide pirrolizidínico N.I.	94.0644, 107.0725, 120.0803, 134.0958, 135.1039, 198.1125, 251.1514	Alcaloide pirrolizidínico	3	-
6	3.09	326.1622	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	-7.3	Monocrotalina	94.0652, 106.0649, 108.0807, 120.0814, 121.0893, 122.0952, 138.0915, 164.1072, 184.0971, 194.1180, 237.1365, 238.1420, 280.1548, 298.1653	Alcaloide pirrolizidínico	1	Prada et al., 2020; Scupinari et al., 2020; Zhang et al., 2017.
7	4.00	340.1757	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	-1.3	Alcaloide pirrolizidínico N.I.	94.0643, 120.0803, 121.0879, 138.0909, 208.1329, 251.1523, 294.1704	Alcaloide pirrolizidínico	3	-
8	4.22	342.1563	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	-5.9	Monocrotalina N-óxido	94.0647, 118.0648, 119.0724, 120.0802, 136.0756, 137.0833, 236.1278	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020; Scupinari et al., 2020.
9	4.41	340.1763	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	-2.9	14-Metilmonocrotalina	94.0649, 120.0805, 121.0881, 138.0910, 164.1067, 208.1332, 236.1275, 251.1515, 294.1699	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020.

10	4.71	310.1647	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	0.3	Alcaloide pirrolizidínico N.I.	94.0648, 120.0803, 121.0842, 138.0907	Alcaloide pirrolizidínico	3	Prada et al., 2020.
11	4.99	312.1806	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	-0.1	Retusina	96.0800, 120.0803, 122.0959, 140.1067, 158.1173, 266.1747, 284.1854	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020.
13	5.32	310.1646	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	1.2	Crotaleschenina	94.0647, 120.0800, 138.0909, 156.1007, 282.1700	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020.
15	5.56	310.1649	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	0.7	Crispatina	94.0649, 120.0798, 138.0907, 266.1379	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020.
16	5.90	773.2153	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	-2.6	Flavonoide glicosilado N.I.	85.0280, 129.0541, 303.0498, 304.0524, 465.1033, 466.1051, 611.1620	Flavonoide glicosilado	3	-
17	6.02	611.1636	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	-4.5	Rutina	85.0282, 129.0542, 303.0501, 304.0532, 305.0547, 465.1035, 466.1064, 467.1073	Flavonoide glicosilado	2	Sut et al., 2020; Sinan et al., 2020.
21	6.55	595.1676	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	3.5	Flavonoide glicosilado N.I.	85.0280, 129.0535, 287.0546, 288.0588, 449.1078	Flavonoide glicosilado	3	-
23	7.10	336.1806	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	-1.2	Integerrimina	94.0650, 120.0801, 138.0911, 308.1858	Alcaloide pirrolizidínico	2	Prada et al., 2020; Zhang et al., 2017.
28	7.87	289.0705	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.4	Flavonoide N.I.	135.0437, 153.0177, 163.0377	Flavonoide	3	-
30	8.29	305.0655	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	0.3	Flavonoide N.I.	123.0437, 149.0229, 153.0178, 185.0594, 213.0539, 231.0648, 241.0488, 259.0594, 287.0542	Flavonoide	3	-
33	8.81	449.1089	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-2.4	Isorientina	124.0383, 153.0175, 229.0485, 303.0496, 304.0512	Flavonoide glicosilado	2	Deepha et al., 2014; Xie et al., 2017.
38	9.49	787.2093	C <sub>37</sub> H <sub>38</sub> O <sub>19</sub>	-1.7	Flavonoide glicosilado N.I.	85.0281, 177.0542, 178.0572, 303.0490, 304.0530, 321.0961, 339.1071, 641.1512, 642.1533	Flavonoide glicosilado	3	-
43	10.87	289.0713	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-2.0	Flavonoide N.I.	89.0382, 107.0485, 117.0329, 123.0436, 135.0436, 145.0280, 153.0181, 154.0211, 163.0388, 164.0422, 179.0332, 271.0594	Flavonoide	3	-
44	12.36	273.0760	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-1.1	Naringenina	91.0538, 119.0486, 123.0435, 147.0438, 148.0472, 153.0180, 154.0211, 255.0640	Flavonoide	1	Ko et al., 2004; Sinan et al., 2020.

45	12.48	271.0597	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.4	Genisteína	91.0538, 119.0488, 147.0436, 153.0178, 215.0697, 243.0646, 253.0483	Flavonoide	1	Elgindi et al., 2009.
Modo Negativo									
16	5.88	771.2022	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	-3.0	Flavonoide glicosilado N.I.	299.0197, 462.0818, 463.0858, 609.1480	Flavonoide glicosilado	3	-
24	7.45	163.0400	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.5	Ácido <i>p</i> -cumárico	119.0502	Fenólico	1	Sinan et al., 2020.
29	7.90	449.1097	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-1.7	Flavonoide glicosilado N.I.	135.0451, 151.0039, 175.0039, 287.0568, 288.0603	Flavonoide glicosilado	3	-
30	8.31	303.0520	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	-3.3	Flavonoide N.I.	83.0134, 123.0452, 125.0245, 151.0039, 152.0112, 153.0192, 175.0402, 217.0510, 275.0570, 285.0414	Flavonoide	3	-
33	8.81	447.0945	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-3.2	Isoorientina	135.0451, 151.0039, 255.0304, 271.0251, 287.0568, 300.0282, 301.0349, 302.0382	Flavonoide glicosilado	2	Deepha et al., 2014; Xie et al., 2017.
34	8.90	433.1149	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>20</sub>	-2.1	Flavonoide glicosilado N.I.	271.0618	Flavonoide glicosilado	3	-
39	9.57	287.0568	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-2.3	Flavonoide N.I.	125.0243, 177.0561, 259.0619	Flavonoide	3	-
43	10.86	287.0572	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-3.7	Flavonoide N.I.	83.0138, 107.0136, 135.0453, 136.0486, 151.0040	Flavonoide	3	-
44	12.36	271.0626	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-5.6	Naringenina	83.0135, 93.0343, 107.0138, 119.0505, 120.0537, 151.0041, 177.0196, 187.0407	Flavonoide	1	Ko et al., 2004; Sinan et al., 2020
45	12.46	269.0463	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-3.2	Genisteína	119.0503, 133.0294	Flavonoide	1	Elgindi et al., 2009.

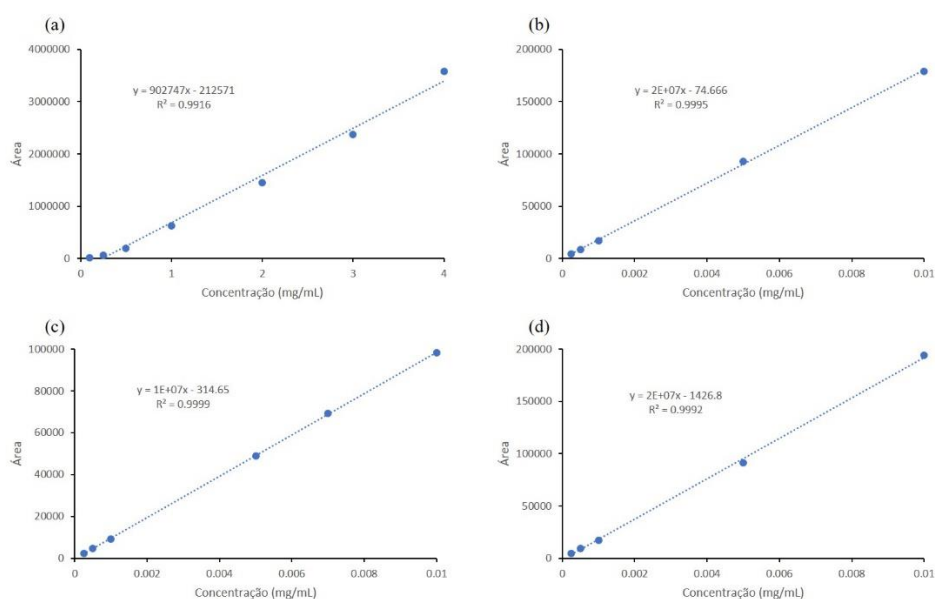
T.R.: Tempo de retenção.

N.C.: Nível de confiança (a descrição dos níveis de confiança pode ser consultada no Anexo I).

N.I.: Não identificado.

### 4.3 Análises quantitativas dos extratos hidroetanólicos por UPLC-UV-ELSD

A análise quantitativa dos extratos hidroetanólicos através das curvas de calibração (Figura 8) permitiu a quantificação dos compostos daidzeína e genisteína nas raízes, e monocrotalina, naringenina e genisteína nas sementes (Tabela 4). Os compostos monocrotalina nas raízes, daidzeína nas sementes e os quatro compostos nas folhas não estavam presentes nas amostras a nível de detecção, e por isso não foram quantificados nestas partes da planta. Os espectros UV desses compostos nas amostras e de seus respectivos padrões podem ser consultados no Apêndice III.



**Figura 8.** Curvas de calibração dos padrões de (a) monocrotalina, (b) daidzeína, (c) naringenina e (d) genisteína.

**Tabela 4.** Quantidade média dos compostos monocrotalina, daidzeína, naringenina e genisteína produzidos por raízes e sementes de *Crotalaria spectabilis* (média  $\pm$  erro padrão, em mg/g).

Composto	T.R. (min)	Raízes (mg/g)	Sementes (mg/g)
Monocrotalina	3.99	-	27.721 $\pm$ 1.005
Daidzeína	9.53	0.197 $\pm$ 0.064	-
Naringenina	11.21	-	0.214 $\pm$ 0.003
Genisteína	11.33	0.033 $\pm$ 0.006	0.013 $\pm$ 0.0002

T.R.: Tempo de retenção.

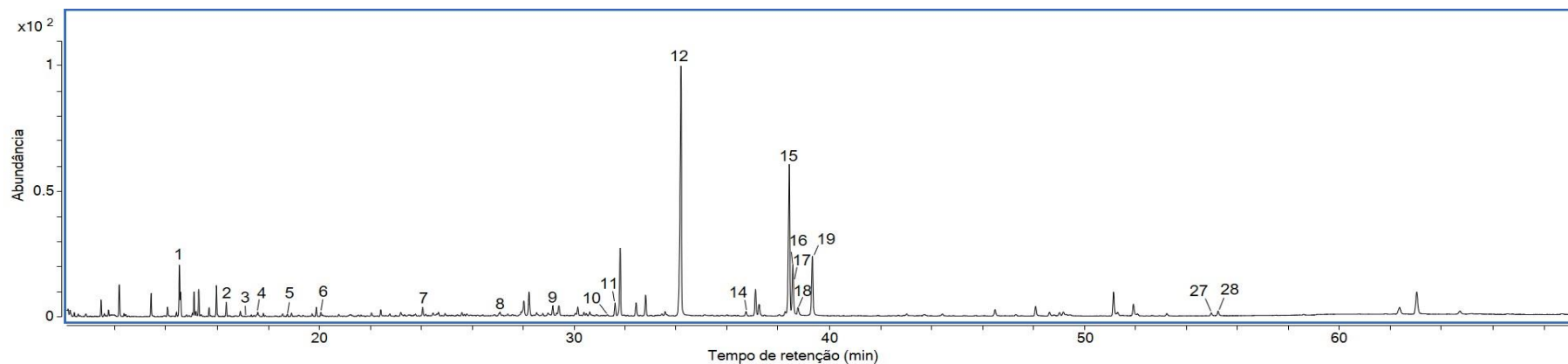
#### 4.4 Análises químicas dos extratos derivatizados por GC-FID e GC-MS

A análise por GC-MS dos extratos derivatizados permitiu a detecção de 20 compostos nas raízes (Figura 9), 21 compostos nas folhas (Figura 10) e 26 compostos nas sementes (Figura 11) de *C. spectabilis*, conforme demonstra a Tabela 5. Os números dos picos em cada um dos cromatogramas são correspondentes aos números da Tabela 5. Os espectros de massas correspondentes aos compostos identificados estão apresentados no Apêndice I.

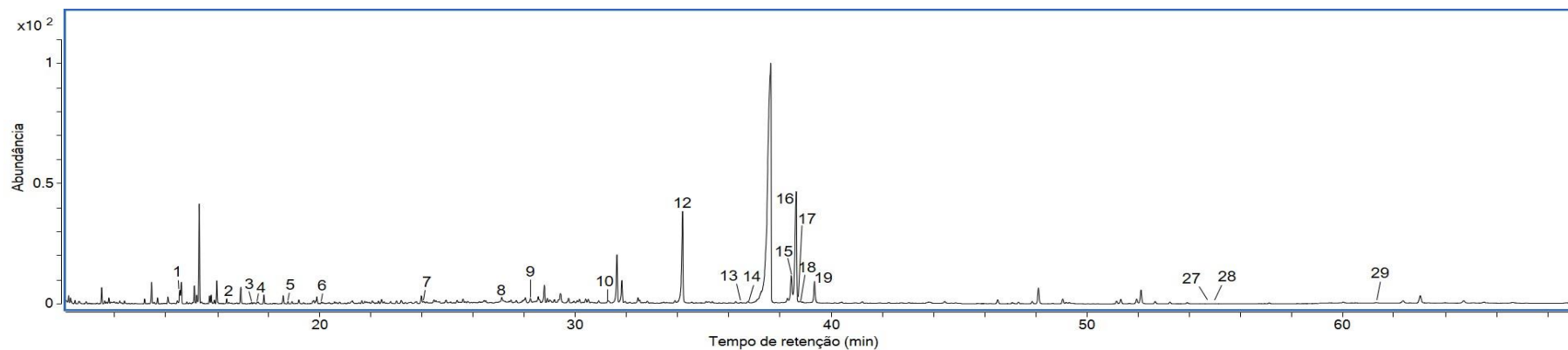
Todos os compostos encontrados nos extratos foram detectados pelo GC-MS em sua forma derivatizada. Para os alcaloides pirrolizidínicos não identificados, foi feita uma prévia identificação da classe química, com base na análise dos padrões de fragmentação, que é comum à esta classe, gerando íons característicos em  $m/z$  93, 120, 136 e 236 (Flores et al., 2009). Os espectros de massas correspondentes a esses compostos estão apresentados no Apêndice IV.

Foram identificados quatro compostos fenólicos nos extratos de *C. spectabilis* (Tabela 5), sendo os ácidos *p*-hidroxibenzóico e *p*-cumárico encontrados em raízes, folhas e sementes, o ácido vanílico em raízes e folhas, e o ácido cafeico somente nas folhas. Os alcaloides pirrolizidínicos foram identificados nas sementes. A monocrotalina, que é encontrada em grande quantidade nas sementes de crotalária (Scupinari et al., 2020), foi também detectada na análise por LC-MS nas raízes e nas folhas, no modo de íon positivo (Figuras 5a e 6a), indicando que pode haver translocação desse composto da semente para outras partes da planta, conforme o seu desenvolvimento. Esse composto não foi detectado nem a nível de traços nas raízes e nas folhas nas análises por GC-MS.

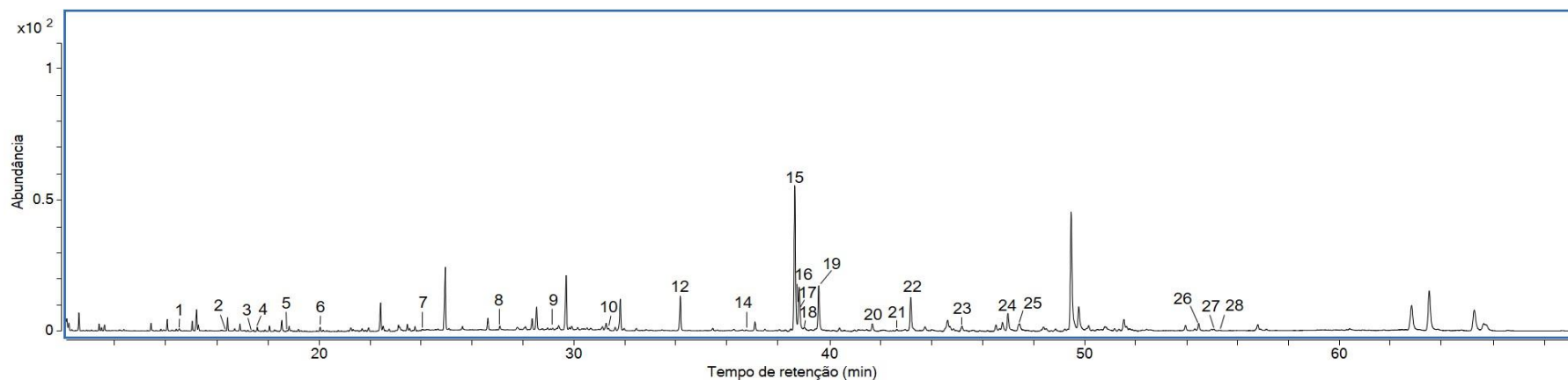
Os compostos da rota das lipoxigenases como os ácidos linoleico,  $\alpha$ -linolênico, ácidos *cis* e *trans* 9-octadecenoico e o ácido esteárico foram identificados em todas as partes da planta avaliadas nas análises por GC-MS, sendo que os ácidos  $\alpha$ -linolênico e *cis*-9-octadecenoico (compostos 16 e 17) estavam coeluído no mesmo pico. Os flavonoides identificados por GC-MS, todos na forma aglicona, foram naringenina nas sementes, quercetina nas folhas, e genisteína e daidzeína nas três partes avaliadas. Diversos flavonoides glicosilados foram identificados nas análises por LC-MS, mas não foram detectados nas análises por GC-MS.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico obtido na análise por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de raízes de *Crotalaria spectabilis*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 5.



**Figura 10.** Perfil cromatográfico obtido na análise por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de folhas de *Crotalaria spectabilis*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 5.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico obtido na análise por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de sementes de *Crotalaria spectabilis*. Os números dos compostos são correspondentes aos números da Tabela 5.

**Tabela 5.** Quantidade média dos compostos identificados nas análises por GC-MS dos extratos derivatizados com MSTFA de raízes, folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis* (média  $\pm$  erro padrão, em mg/g). O número de cada composto corresponde ao número do pico marcado nos cromatogramas das Figuras 9, 10 e 11.

Nº	Composto	IR	Fórmula molecular	Classe química	Raízes	Folhas	Sementes
1	Ácido benzoico (TMS)	1247	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.056 $\pm$ 0.007	0.050 $\pm$ 0.012	0.046 $\pm$ 0.003
2	Ácido succínico bis(TMS) *	1312	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>2</sub>	Ácido carboxílico	0.023 $\pm$ 0.006	0.040 $\pm$ 0.009	0.043 $\pm$ 0.001
3	Ácido fumárico bis(TMS) *	1351	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>2</sub>	Ácido carboxílico	0.010 $\pm$ 0.003	0.010 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001
4	Ácido nonanoico (TMS)	1360	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.018 $\pm$ 0.005	0.009 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001
5	Ácido glutárico bis(TMS) *	1403	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>2</sub>	Ácido carboxílico	0.006 $\pm$ 0.001	0.013 $\pm$ 0.003	0.008 $\pm$ 0.001
6	Ácido decanoico (TMS)	1457	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.014 $\pm$ 0.005	0.012 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.001
7	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico bis(TMS)	1623	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>2</sub>	Ácido fenólico	0.018 $\pm$ 0.004	0.015 $\pm$ 0.005	0.049 $\pm$ 0.002
8	Ácido vanílico bis(TMS)	1758	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>2</sub>	Ácido fenólico	0.013 $\pm$ 0.003	0.080 $\pm$ 0.023	0.028 $\pm$ 0.001



9	Ácido tetradecanoico (TMS) *	1846	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.016 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.020 ± 0.002
10	Ácido <i>p</i> -cumárico bis(TMS)	1933	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>2</sub>	Ácido fenólico	0.016 ± 0.002	0.021 ± 0.004	0.060 ± 0.002
11	Ácido pentadecanoico (TMS)	1945	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.181 ± 0.082	-	-
12	Ácido palmítico (TMS)	2044	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	1.324 ± 0.120	0.402 ± 0.035	0.396 ± 0.010
13	Ácido cafeico tris(TMS)	2133	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>3</sub>	Ácido fenólico	-	0.009 ± 0.002	-
14	Ácido heptadecanoico (TMS)	2143	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.023 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001
15	Ácido linoleico (TMS)	2206	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	1.224 ± 0.082	0.222 ± 0.033	0.362 ± 0.024
16	Ácido $\alpha$ -linolênico (TMS)	2211	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.382 ± 0.033	1.028 ± 0.112	0.112 ± 0.009
17	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico (TMS)	2214	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.049 ± 0.008	0.009 ± 0.001	0.019 ± 0.002
18	Ácido <i>trans</i> -9-octadecenoico (TMS)	2220	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.049 ± 0.008	0.009 ± 0.001	0.019 ± 0.002
19	Ácido esteárico (TMS)	2242	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> Si	Ácido carboxílico	0.186 ± 0.018	0.110 ± 0.007	0.088 ± 0.002
20	Alcaloide pirrolizidínico N.I. *	2321	-	Alcaloide pirrolizidínico	-	-	0.066 ± 0.003
21	Alcaloide pirrolizidínico N.I. *	2358	-	Alcaloide pirrolizidínico	-	-	0.041 ± 0.003
22	Monocrotalina (TMS)	2379	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>6</sub> Si	Alcaloide pirrolizidínico	-	-	0.288 ± 0.022
23	Alcaloide pirrolizidínico N.I. *	2459	-	Alcaloide pirrolizidínico	-	-	0.063 ± 0.005
24	Alcaloide pirrolizidínico N.I. *	2531	-	Alcaloide pirrolizidínico	-	-	0.367 ± 0.027
25	Alcaloide pirrolizidínico N.I. *	2547	-	Alcaloide pirrolizidínico	-	-	0.109 ± 0.025
26	Naringenina tris(TMS)	2861	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>3</sub>	Flavonoide	-	-	0.036 ± 0.004
27	Daidzeína bis(TMS)	2898	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>3</sub>	Flavonoide	0.135 ± 0.034	0.010 ± 0.005	0.017 ± 0.001
28	Genisteína tris(TMS)	2930	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>2</sub>	Flavonoide	0.019 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.015 ± 0.001
29	Quercetina penta(TMS)	3174	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub> Si <sub>5</sub>	Flavonoide	-	0.021 ± 0.004	-

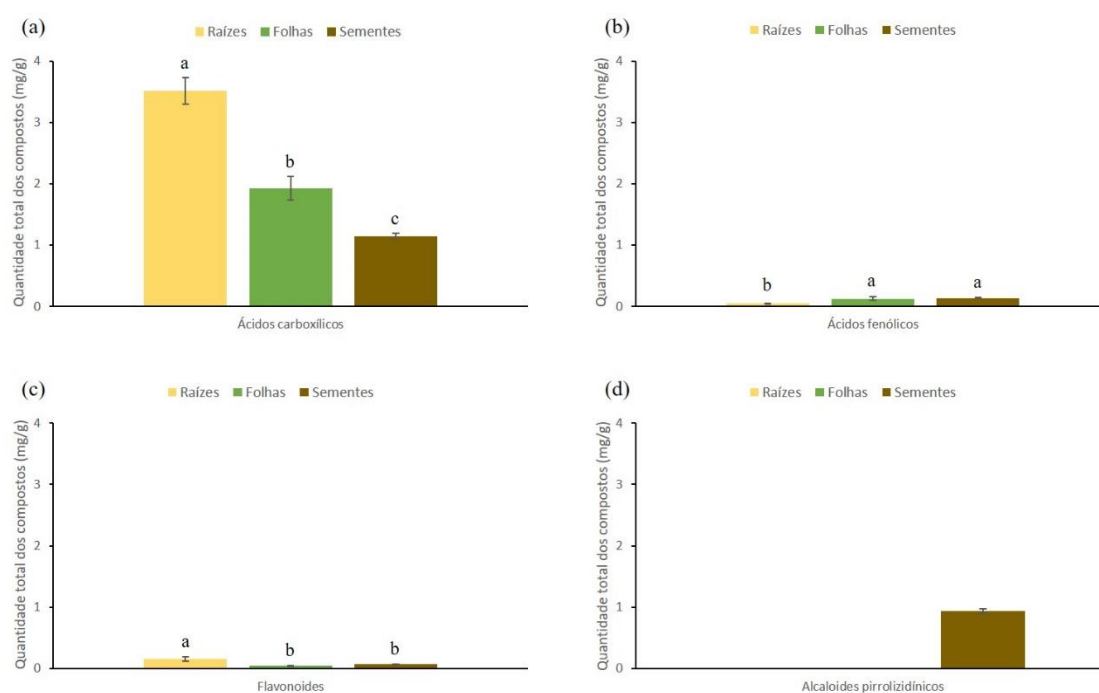
TMS: Trimetilsilil.

\* Tentativa de identificação dos compostos.

IR: Índice de retenção calculado em coluna DB-5MS.

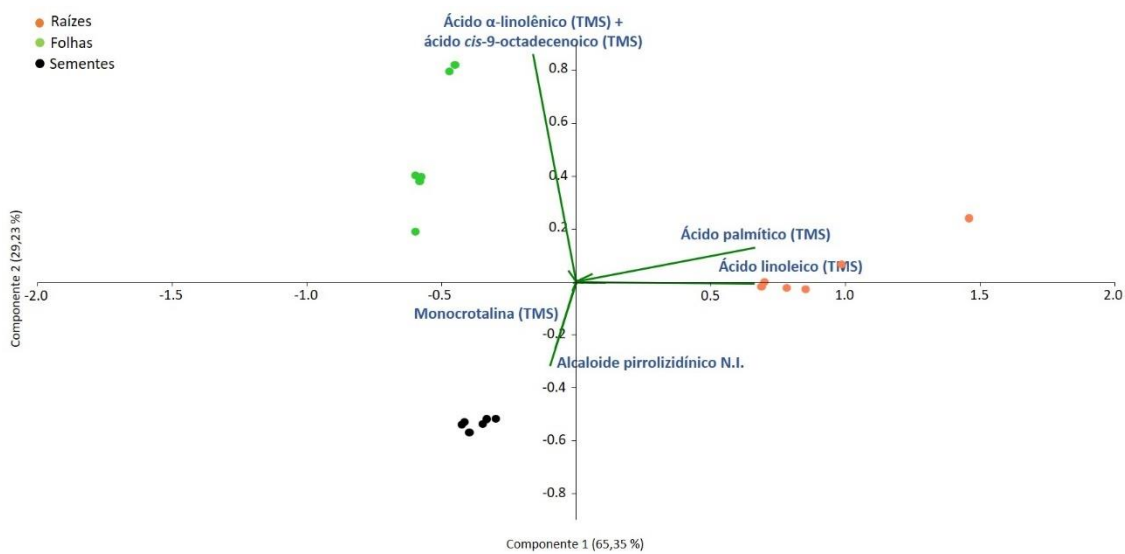
N.I.: Não identificado.

Para as análises estatísticas por classe química, dos compostos derivatizados, foi possível observar diferenças significativas entre as produções por cada parte da planta. Para os ácidos carboxílicos, todas as três partes da planta avaliadas apresentaram diferença significativa ( $F = 64,259$ ;  $gl = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Para os ácidos fenólicos e flavonoides, não houve diferença significativa na produção entre as folhas e as sementes, mas houve diferença entre as raízes comparada com as folhas e sementes (ácidos fenólicos:  $F = 8,509$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,003$  e flavonoides:  $F = 7,365$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,006$ ). E quanto à classe dos alcaloides pirrolizidínicos, foram produzidos somente pelas sementes (Figura 12).



**Figura 12.** Quantidade total de compostos dos extratos derivatizados com MSTFA das raízes, folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis* (soma  $\pm$  erro padrão, em mg/g), separados pelas classes químicas (a) ácidos carboxílicos, (b) ácidos fenólicos, (c) flavonoides e (d) alcaloides pirrolizidínicos. Barras seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha = 95\%$ ).

De acordo com o diagrama obtido pela PCA (Figura 13) para os compostos não voláteis derivatizados das raízes, folhas e sementes de crotalária, é possível observar a separação entre as três partes da planta avaliados, e destaca-se e a contribuição dos compostos ácido palmítico (TMS) e ácido linoleico (TMS) para as raízes, dos ácidos  $\alpha$ -linolênico (TMS) e *cis*-9-octadecenoico (TMS) para as folhas, e dos alcaloides pirrolizidínicos monocrotalina (TMS) e um dos não identificados para as sementes.



**Figura 13.** Análise de componentes principais dos compostos não voláteis derivatizados com MSTFA das raízes, folhas e sementes de *Crotalaria spectabilis*.

## 5. DISCUSSÃO

As plantas do gênero *Crotalaria* sintetizam alcaloides pirrolizidínicos e seus N-óxidos (Prada et al., 2020; Scupinari et al., 2020), bem como uma diversidade de flavonoides (Awouafack et al., 2011; Hu et al., 2017). Neste trabalho, foi avaliado o perfil químico dos metabólitos secundários não voláteis de *C. spectabilis*, pertencentes às duas classes químicas anteriormente citadas. Muitos dos compostos identificados estão de acordo com trabalhos já publicados na literatura para diferentes espécies deste gênero, o que pode ser verificado pelas referências contidas nas Tabelas 1, 2 e 3.

Para a obtenção do perfil químico de compostos não voláteis, foram utilizadas as técnicas de cromatografias líquida e gasosa acopladas ao espectrômetro de massas (LC-MS e GC-MS). Para a análise deste tipo de metabólitos secundários, a técnica mais usualmente utilizada é a cromatografia líquida, por serem compostos de maior polaridade e peso molecular, e conseqüentemente pouco ou não voláteis e termolábeis, e assim não serem adequados para análises em cromatografia gasosa, que é mais apropriada para a análise de compostos voláteis (Allwood & Goodacre, 2010). Porém, com uma reação de derivatização, torna-se viável a análise desse tipo de compostos por cromatografia gasosa, uma vez que ela reduz a polaridade do composto e aumenta a sua volatilidade (Takeo et al., 2017; Beale et al., 2018) mantendo a estrutura química semelhante à original. A desvantagem é o aumento de etapas experimentais até a preparação final da amostra que será analisada, visto que, para isso, é necessário fazer uma etapa de extração e posteriormente a reação com o reagente derivatizante, o que leva a um gasto maior de tempo e torna este método mais complexo e trabalhoso.

Além disso, para amostras complexas, o método utilizado no cromatógrafo gasoso precisa ser longo e com uma rampa de temperatura com um gradiente mais lento, uma vez que, mesmo que a reação confira volatilidade aos compostos, ainda assim eles têm maior peso molecular e precisam de temperaturas elevadas para volatilizarem e chegarem até o detector. Já na cromatografia líquida, não há a necessidade de derivatizar os compostos antes da análise.

Ainda assim, a técnica de LC-MS possui desvantagens, como a supressão de sinal devido a efeitos de matriz, especialmente quando é usada ionização por *electrospray* (Pezzatti et al., 2020), e a falta de reprodutibilidade, uma vez que os espectros de massas gerados dependem das condições experimentais, como energia utilizada, composição da fase móvel e solvente utilizado na amostra, situação que não ocorre na ionização por

elétrons em GC-MS, que fornece espectros altamente reprodutíveis e independentes desses fatores, e devido à essa capacidade de reproduzir consistentemente padrões de fragmentação, as bibliotecas de GC-MS são melhores desenvolvidas em comparação com as de LC-MS, que dependem de bancos de dados e *softwares* de fragmentação *in silico* para comparação dos espectros MS/MS, que apesar de ser realizada para reduzir erros, ainda apresentam várias limitações (Dudzic et al., 2018; Zeki et al., 2020; Pezzatti et al., 2020). Além disso, os índices de retenção em cromatografia gasosa são usados como uma etapa secundária independente de massa na identificação de metabólitos, o que também aumenta a confiabilidade na identificação (Zeki et al., 2020).

Desta forma, identificar metabólitos em LC-MS é uma etapa desafiadora. Todas essas ferramentas são úteis para auxiliar, porém, devido à variabilidade dos compostos sugeridos ser muito grande, ainda é imprescindível o olhar do especialista. À medida que a tecnologia avança, e com a quantidade de bancos de dados disponíveis, os algoritmos tendem a ficar cada vez melhores e mais confiáveis.

Na metabolômica por exemplo, para a elucidação completa de uma estrutura, são requeridas diversas informações do composto, que nem sempre são de fácil acesso, e devido a isso, é possível determinar diferentes níveis de confiança para a identificação de um composto, através das descrições estabelecidas pela *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), que definiu níveis de confiança de 0 a 4, aumentando-se a confiança conforme diminui-se o valor do nível, a depender da combinação de uma, duas ou mais propriedades ortogonais (descrições de cada nível podem ser consultadas no Anexo I) (Blazenovic et al., 2018; Pezzatti et al., 2020). Nas análises por LC-MS apresentadas neste capítulo, foi observado que alguns flavonoides glicosilados não tiveram identificação precisa da estrutura, mas foi possível dizer a qual classe química pertenciam, o que se encaixa no nível 3 de confiança para a tentativa de identificação de um composto, por exemplo.

Cabe ressaltar que esses flavonoides glicosilados foram encontrados com variadas estruturas e íons precursores nas análises por LC-MS, mas não foram detectados no GC-MS. Esses compostos possuem diversas hidroxilas e alto peso molecular, e quando derivatizados, ficam fora do alcance de massas do GC-MS utilizado. Em contrapartida, uma diversidade de ácidos fenólicos e carboxílicos foi encontrada nas análises por GC-MS e não foram detectados nas análises por LC-MS, uma vez que estes compostos têm uma capacidade de ionização por *electrospray* muito baixa. Este fato nos ajuda a concluir que o ideal é a combinação entre as técnicas de GC-MS e LC-MS, para se obter

a identificação precisa dos metabólitos, visto que cada uma das técnicas possui vantagens exclusivas entre si e são mais adequadas para cada tipo de metabólito que se deseja identificar.

Os alcaloides pirrolizidínicos foram detectados nos extratos de sementes pelas duas técnicas, e o alcaloide pirrolizidínico majoritário monocrotalina foi identificado por LC-MS em todas as partes analisadas da planta, mas não foi encontrado nas raízes e folhas por GC-MS, e isso se deve à menor sensibilidade da técnica. Nas análises de LC-MS foi utilizada uma alíquota do extrato, que corresponde a 0,02 mg de material vegetal por  $\mu\text{L}$  para as raízes e 0,04 mg/ $\mu\text{L}$  para as folhas e sementes, já na análise de GC-MS utilizou-se o correspondente a 0,07 mg de material vegetal por  $\mu\text{L}$  para raízes e 0,17 mg/ $\mu\text{L}$  para folhas e sementes, o que indica a maior sensibilidade da técnica de LC-MS em relação à técnica de GC-MS para esse grupo de substâncias. No entanto, alguns compostos que possuem baixa ionização por *electrospray*, como é o caso de ésteres metílicos e etílicos, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos e terpenos, mesmo com cadeia longa, a análise por GC-MS é mais indicada, pois esses compostos ionizam melhor pelo método de ionização por elétrons. Isso explica por que os ácidos graxos como palmítico, linoleico,  $\alpha$ -linolênico, *cis* e *trans* 9-octadecenoico e esteárico, que são importante precursores de uma série de metabólitos secundários da rota das lipoxigenases em plantas, não foram detectados por LC-MS com ionização por *electrospray*.

Em contrapartida, monocrotalina N-óxido foi detectada por LC-MS mas não foi detectada por GC-MS, devido ao fato dos N-óxidos serem termicamente instáveis e se decomporem na porta de injeção do cromatógrafo gasoso, o que não ocorre na interface do *electrospray* em LC-MS (Prada et al., 2020). A monocrotalina e seu N-óxido também não foram detectados nos espectros de UV conduzidos tanto pelo HPLC quanto pelo UHPLC, embora haja relato na literatura da ocorrência de absorção desses compostos entre 220-230 nm (Wang et al., 2009; Aydin & Letzel, 2013; Tang et al., 2017). Entretanto, pelo detector de massas no LC-MS foi possível observar os picos relativos a esses compostos. Além disso, vale ressaltar que todos os alcaloides pirrolizidínicos encontrados nas análises de LC-MS foram detectados somente no modo de íon positivo. Esses compostos apresentam um átomo de nitrogênio, o que confere basicidade à molécula, e devido a isso, possuem facilidade para serem protonadas e dificuldade para serem desprotonadas, fazendo com que conseqüentemente não apareçam nas análises em modo de íon negativo. Isso também explica por que o ácido *p*-cumárico foi detectado somente nas análises em modo de íon negativo, visto que ácidos são mais facilmente

desprotonados e, conseqüentemente, observados no modo de íon negativo (Crotti et al., 2006).

A análise química dos extratos por LC-MS e GC-MS permitiu identificar o perfil de metabólitos secundários de *C. spectabilis*. Alguns flavonoides e alcaloides pirrolizidínicos já foram descritos, mas pela primeira vez para essa espécie de *Crotalaria* foram identificados os flavonoides daidzeína, genisteína, quercetina e naringenina. Compostos da classe química dos flavonoides podem ter efeito deletério para diferentes espécies de insetos em outras culturas, como na soja para o percevejo *N. viridula* e para a lagarta *A. gemmatilis* (Piubelli, et al., 2003; Piubelli, et al., 2005). Estudos futuros poderiam avaliar se estes compostos presentes nas raízes e folhas de *C. spectabilis* conferem resistência às plantas contra herbívoros.

Um estudo recente com sementes e folhas de *C. spectabilis*, com plantas com 90 dias após a germinação, mostrou a presença de monocrotalina, monocrotalina N-óxido, ácido cítrico, quercetina glicosilada e isoharmetina glicosilada, e dois açúcares di e tri hexose somente (Scupinari et al., 2020). Em nosso estudo, foram utilizadas plantas com 45 dias após a germinação, o que explicaria a maior quantidade de metabólitos secundários identificados aqui, visto que as plantas no início do estágio vegetativo investem mais na produção de compostos químicos que atuam na sua defesa, e conforme desenvolvem-se, passam a investir mais na química envolvida no seu desenvolvimento e na formação das estruturas do estágio reprodutivo, flores e frutos (Taiz et al., 2017).

As análises realizadas neste trabalho mostraram que a presença dos alcaloides pirrolizidínicos concentram-se nas sementes, indicando que estes compostos podem ter efeito contra patógenos como nematoides (Wang et al., 2002; Thoden & Boppré, 2010), fungos, bactérias, e herbívoros de sementes e plântulas, protegendo a planta no início da sua germinação. Os estudos conduzidos indicam que a quantidade de alcaloides pirrolizidínicos nas sementes e nos primeiros dias após a germinação sejam altos, protegendo as plantas do ataque dos insetos e outras pragas quando jovem, e conforme a planta desenvolve-se, os níveis desses compostos vão diminuindo. Scupinari e colaboradores (2020) relataram uma quantidade de monocrotalina igual a  $17,393 \pm 0,528$  mg/g de material vegetal seco nas sementes de *C. spectabilis* e  $0,141 \pm 0,008$  mg/g nas folhas com 90 dias após a germinação, o que corresponde a uma concentração 123 vezes maior nas sementes do que nas folhas. Já Prada e colaboradores (2020) relataram uma quantidade de monocrotalina igual a 15 mg/g nas sementes, 0,1 mg/g nas folhas, 0,7 mg/g nas raízes e 0,6 mg/g nas flores de *C. spectabilis* no estágio reprodutivo, o que

corresponde a uma concentração 150 vezes maior nas sementes do que nas folhas. Em nosso estudo, foi encontrada uma quantidade de  $27,721 \pm 1,005$  mg/g de monocrotalina nas sementes de *C. spectabilis*, e esse mesmo composto não foi encontrado nas folhas nem nas raízes a nível quantificável pelo detector por espalhamento de luz. Estudos futuros poderiam avaliar se os níveis de monocrotalina diminuem com o desenvolvimento da planta.

Para a análise quantitativa da monocrotalina nas sementes, a técnica de GC-FID associada à derivatização revelou valores cerca de 100 vezes menores comparada às quantidades encontradas através do UPLC-ELSD, o que nos leva a inferir que essa não seja a técnica mais adequada para a análise desse composto. Isso pode ter acontecido devido ao processo de extração em éter etílico, uma vez que a monocrotalina tem baixa solubilidade neste solvente, fazendo com que a maior parte desse composto provavelmente tenha permanecido na fase aquosa da extração. Outro motivo para essa diferença de quantidade pode estar relacionado com a reação de derivatização, uma vez que a monocrotalina está presente em grandes quantidades nos extratos de sementes, e a quantidade de reagente derivatizante utilizada pode ter sido menor do que a necessária. Para confirmar isso, testes podem ser feitos para determinar qual seria a quantidade ideal de MSTFA para reagir com toda a monocrotalina presente nas amostras. Além disso, o ácido gálico, composto utilizado como padrão interno, possui estrutura semelhante com os fenólicos, mas não com a monocrotalina, de modo que esse composto não seja o ideal para quantificar compostos com estruturas semelhantes à da monocrotalina, uma vez que eles vão se comportar de diferentes maneiras no detector. O ideal seria quantificar a monocrotalina através de uma curva de calibração utilizando o padrão sintético.

Entretanto, para os compostos fenólicos, a extração em éter etílico foi eficiente, de modo que a análise quantitativa dos flavonoides daidzeína nas raízes e genisteína nas raízes e sementes através das técnicas de GC e LC apresentaram valores semelhantes, o que nos leva a inferir que, mesmo a técnica de LC sendo a mais usual para a análise desses compostos, a técnica de GC associada à extração em éter etílico e ao método de derivatização utilizando um padrão interno com grupo fenólico para quantificar também pode ser eficaz.

Os alcaloides pirrolizidínicos são conhecidos por seus efeitos negativos em insetos herbívoros, podem atuar como inibidores de alimentação e já tiveram sua toxicidade relatada para algumas lagartas do gênero *Spodoptera* (Macel et al., 2005; Nuringtyas et al., 2014). A toxicidade de alcaloides pirrolizidínicos produzidos pela planta *Jacobaea*

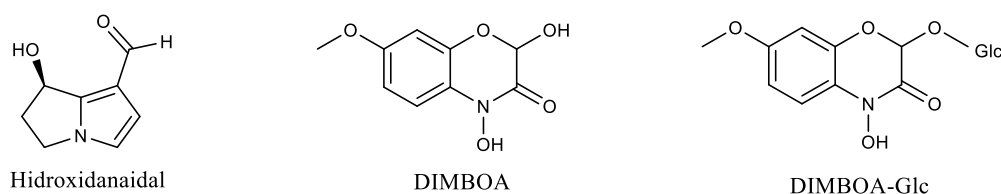


*vulgaris* Gaertn (Asterales: Asteraceae) foi testada em lagartas de *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), em que os compostos testados foram isolados das plantas com 14 dias, preparados em solução etanólica e injetados na hemolinfa das lagartas de terceiro ínstar em concentrações de 0-50 µg/lagarta, e foi observado que os alcaloides jacobina e erucifolina foram os mais tóxicos, e senecionina não foi tóxica nas concentrações testadas, sugerindo o importante papel de alguns deles na defesa da planta contra herbívoros generalistas (Nuringtyas et al., 2014). Já Macel e colaboradores (2005) encontraram indicações de que a mistura sintética dos alcaloides pirrolizidínicos senecionina, senecifilina e senecircina adicionada à dieta das lagartas de terceiro instar de *S. exigua* nas concentrações de 0,3 a 3 vezes o equivalente ao encontrado nas plantas de *Senecio jacobaea* L. (Asterales: Asteraceae) pode ser mais dissuasiva do que os compostos individuais para as lagartas.

Outro estudo relatou que alcaloides pirrolizidínicos como monocrotalina, acetilusaramina e otosenina apresentaram efeitos tóxicos ao serem inseridos na dieta das lagartas de sexto instar de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae), demonstrando que esses compostos possuem efeitos deletérios para a lagarta (Domínguez et al., 2008). Esses estudos mostram que os efeitos tóxicos dos alcaloides pirrolizidínicos são dependentes da estrutura e podem ter diferentes efeitos entre as espécies de insetos, de modo que a variação estrutural desses compostos pode influenciar sua eficácia na defesa da planta. Esses compostos não estão presentes nas plantas de milho, de modo que pode ser um dos motivos desta planta ser o hospedeiro preferencial de *S. frugiperda*, lagarta do mesmo gênero das anteriormente citadas.

Sendo assim, plantas do gênero *Crotalaria* produzem alcaloides pirrolizidínicos como defesa direta contra herbívoros generalistas. Entretanto, herbívoros especialistas podem ser fisiologicamente adaptados para tolerar toxinas ou até mesmo usá-las para se beneficiar contra predação, de forma que podem sequestrar, transformar e usar compostos tóxicos sem efeitos negativos ou com um impacto menos prejudicial (Ali & Agrawal, 2012). As lagartas especialistas *U. ornatix* se alimentam principalmente de sementes verdes de diferentes espécies de *Crotalaria*, parte da planta que contém as maiores concentrações de alcaloides pirrolizidínicos, e esses alcaloides demonstraram proteger diferentes estágios de desenvolvimento desses insetos contra predadores (Ferro et al., 2006; Cogni & Trigo, 2016), uma vez que as lagartas os retém por metamorfose, ou seja, elas passam esses compostos para os adultos, que ficam protegidos contra aranhas, e ao ovipositarem, os transmitem em parte aos ovos, protegendo-os contra formigas, besouros

coccinelídeos e vespas parasitoides (del Campo et al., 2005; Cogni et al., 2012). Além disso, esses alcaloides pirrolizidínicos também agem como precursores na biossíntese dos feromônios sexuais de machos (Flores et al., 2009), que são derivados de hidroxidanaidal (Figura 14). Estudos demonstraram que machos com alta concentração desses compostos são selecionados pelas fêmeas, que são capazes de avaliar a quantidade desses compostos no corpo do macho, que será transferida para elas através do acasalamento, e conseqüentemente proporcionará uma melhor defesa para elas e seus descendentes (Kelly et al., 2012). Já no milho, herbívoros especialistas como a lagarta *S. frugiperda* também são capazes de lidar com benzoxazinoides (Figura 14), compostos que são conhecidos por fornecerem resistência ao milho contra herbívoros e patógenos, enquanto herbívoros generalistas, como *S. exigua* e *S. littoralis* têm seu desenvolvimento afetado por esses compostos (Meyer et al., 2016; Medeiros et al., 2021; Michereff et al., 2022). Estes fatos podem auxiliar a entender o motivo dos compostos da crotalária serem tóxicos para a *S. frugiperda*, e os compostos do milho, não.



**Figura 14.** Estruturas químicas do hidroxidanaidal e dos benzoxazinoides DIMBOA e DIMBOA-Glc.

Ainda não se sabe exatamente quais são os efeitos desses compostos produzidos por *C. spectabilis*, que podem estar agindo negativamente nas lagartas de *S. frugiperda*. Por isso, a identificação e quantificação desses compostos é de suma importância para determinar o nível de toxicidade da planta e avaliar como isso pode estar relacionado aos seus mecanismos de defesa direta e resistência.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali JG & Agrawal AA. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 5, p. 293-302, 2012.
- Allwood JW & Goodacre R. An introduction to liquid chromatography - mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 33-47, 2010.
- Awouafack MD, Spiteller P, Lamshoft M, Kusari S, Ivanova B, Tane P, Spiteller M. Antimicrobial isopropenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 2, p. 272-278, 2011.
- Aydin AA & Letzel T. Simultaneous investigation of sesquiterpenes, pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in Butterbur (*Petasites hybridus*) with an offline 2D-combination of HPLC-UV and LC-MMI-ToF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 74-82, 2013.
- Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, Boughton BA, Kanojia K, Dayalan S, Jones OAH, Dias DA. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, p. 1-31, 2018.
- Beszterda M, Kasperkowiak M, Frański R. Comment on the published data concerning the identification of biochanin A and prunetin by LC/ESI-MS. **Talanta**, v. 211, n. 120733, p. 1-5, 2020.
- Blazenovic I, Kind T, Ji J, Fiehn O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 31, p. 1-23, 2018.
- Boulogne I, Petit P, Ozier-Lafontaine H, Desfontaines L, Loranger-Merciris G. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, 2012.
- Borges M, Birkett M, Aldrich JR, Oliver JE, Chiba M, Murata Y, Laumann RA, Barrigossi JA, Pickett JA, Blassioli-Moraes MC. Sex attractant pheromone from the Rice Stalk Stink Bug, *Tibraca limbativentris* Stal. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 12, p. 2749-2761, 2006.
- Cogni R & Trigo JR. Pyrrolizidine alkaloids negatively affect a generalist herbivore feeding on the chemically protected legume *Crotalaria pallida*. **Neotropical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 252-257, 2016.
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ. A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 6152-6162, 2012.

- Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Espectrometria de massas com ionização por "*electrospray*": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.
- Deepha V, Praveena R, Sivakumar R, Sadasivam K. Experimental and theoretical investigations on the antioxidant activity of isoorientin from *Crotalaria globosa*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, p. 737-745, 2014.
- del Campo ML, Smedley SR, Eisner T. Reproductive benefits derived from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13508-13512, 2005.
- Domínguez DM, Reina M, Santos-Guerra A, Santana O, Agulló T, López-Balboa C, Gonzalez-Coloma A. Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 3, p. 153-166, 2008.
- Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 149-173, 2018.
- Elgindi MR, Mahmoud II, Attia HG. Isoflavones and Fatty Acids from *Crotalaria aegyptiacea*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 589-595, 2009.
- Erb M & Kliebenstein DJ. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39-52, 2020.
- Ferro VG, Guimarães Jr PR, Trigo JR. Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, n. 1, p. 23-29, 2006.
- Flores AS, Azevedo Tozzi AMG, Trigo JR. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 459-469, 2009.
- Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- Hu XR, Chou GX, Zhang CG. Flavonoids, alkaloids from the seeds of *Crotalaria pallida* and their cytotoxicity and anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 143, p. 64-71, 2017.
- Ji X, Khan I, Mosjidis JA, Wang H, Livant P. Variability for the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria juncea* L. **Pharmazie**, v. 60, n. 8, p. 620-622, 2005.
- Kelly CA, Norbutus AJ, Lagalante AF, Iyengar VK. Male courtship pheromones as indicators of genetic quality in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). **Behavioral Ecology**, v. 23, n. 5, p. 1009-1014, 2012.

- Ko HH, Weng JR, Tsao LT, Yen MH, Wang JP, Lin CN. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 4, p. 1011-1014, 2004.
- Koek MM, Muilwijk B, van der Werf J, Hankemeier T. Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1272-1281, 2006.
- Kopp T, Abdel-Tawab M, Mizaikoff B. Extracting and analyzing pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants: a review. **Toxins**, v. 12, n. 320, p. 1-35, 2020.
- Macel M, Bruinsma M, Dijkstra SM, Ooijendijk T, Niemeyer HM, Klinkhamer PG. Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1493-1508, 2005.
- Medeiros DB, Brotman Y, Fernie AR. The utility of metabolomics as a tool to inform maize biology. **Plant Communications**, v. 2, n. 100187, p. 1-23, 2021.
- Meyer J, Murray SL, Berger DK. Signals that stop the rot: regulation of secondary metabolite defences in cereals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 94, p. 156-166, 2016.
- Michereff MF, Nascimento IN, Santana GT, Sarria AL, Borges M, Laumann RA, Withall DM, Caulfield JC, Birkett MA, Blassioli-Moraes MC. Neotropical maize genotypes with different levels of benzoxazinoids affect fall armyworm development. **Physiological Entomology**, v. 47, n. 4, p. 232-241, 2022.
- Munim A, Negishi O, Ozawa T. Antioxidative Compounds from *Crotalaria sessiliflora*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 410-414, 2003.
- NIST. Chemdata.Nist.Gov **Mass Spectrometry Data Center**. 2020. <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:downloads:start>.
- Nuringtyas TR, Verpoorte R, Klinkhamer PG, van Oers MM, Leiss KA. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to *Spodoptera exigua* using insect cell lines and injection bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 6, p. 609-616, 2014.
- Pessoa GP, Santos AB, Souza NC, Alves JAC, Nascimento RF. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.
- Pezzatti J, Boccard J, Codesido S, Gagnebin Y, Joshi A, Picard D, González-Ruiz V, Rudaz S. Implementation of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 1105, p. 28-44, 2020.
- Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Miyakubo SH, Oliveira MCN. Are Chemical Compounds Important for Soybean Resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.

- Piubelli GC, Hoffmann-Campo CB, Arruda IC, Franchini JC, Lara FM. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 5, p. 1223-1233, 2003.
- Prada F, Stashenko EE, Martínez JR. LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 23, p. 4322-4337, 2020.
- Rech C, Ribeiro LP, Bento JMS, Pott CA, Nardi C. Monocrotaline presence in the *Crotalaria* (Fabaceae) plant genus and its influence on arthropods in agroecosystems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, n. 256916, p. 1-14, 2022.
- Renier A, Jourand P, Rapior S, Poinot V, Sy A, Dreyfus B, Moulin L. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060T: a classic process for an atypical symbiont. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1404-1412, 2008.
- Rutties C, Schymanski EL, Wolf S, Hollender J, Neumann S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2016. Acesso disponível em: <<https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta>>.
- Scupinari T, Russo HM, Ferrari ABS, Bolzani VS, Dias WP, Nunes EO, Hoffmann-Campo CB, Zeraik, ML. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 747-755, 2020.
- Sinan KI, Saftić L, Peršurić Ž, Pavelić SK, Etienne OK, Picot-Allain MCN, Mahomoodally MF, Zengin G. A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *Crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols. **South African Journal of Botany**, v. 128, p.101-108, 2020.
- Sut S, Dall'Acqua S, Sinan KI, Bene K, Kumar G, Mahomoodally MF, Picot-Allain C, Zengin G. *Cola caricifolia* (G. Don) K. Schum and *Crotalaria retusa* L. from Ivory Coast as sources of bioactive constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 147, n. 112246, p. 1-11, 2020.
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- Takeo E, Sasano R, Shimma S, Bamba T, Fukusaki E. Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography - mass-spectrometry-based metabolomics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 6, p. 700-706, 2017.
- Tang X, Zhu D, Huai W, Zhang W, Fu C, Xie X, Quan S, Fan H. Simultaneous extraction and separation of flavonoids and alkaloids from *Crotalaria sessiliflora* L. by microwave-assisted cloud-point extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 175, p. 266-273, 2017.

Thoden TC & Boppré M. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2010.

Wang J, Yang L, Wang C, Wang Z. The action of cytochrome p450 enzymes and flavin-containing monooxygenases on the N-oxide of pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 4, n. 2, p. 41-50, 2009.

Wang KH, Sipes BS, Schmitt DP. Crotalaria as a cover crop for nematode management: A review. **Nematropica**, v. 32, n. 1, p. 35-57, 2002.

Wang X, Sun H, Zhang A, Wang P, Han Y. Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 24, p. 3451-3459, 2011.

Xie X, Zhu D, Zhang W, Huai W, Wang K, Huang X, Zhou L, Fan H. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of four flavonoids in *Crotalaria sessiliflora* L. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 632-642, 2017.

Yilmaz B & Arslan S. GC-MS Determination of Atenolol Plasma Concentration after Derivatization with N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. **Chromatographia**, v. 70, n. 9, p. 1399-1404, 2009.

Yoo HS, Lee JS, Kim CY, Kim J. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 5, p. 544-546, 2004.

Zeki OC, Eylem CC, Reçber T, Kır S, Nemutlu E. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 190, n. 113509, p. 1-17, 2020.

Zhang W, Huai W, Zhang Y, Shen J, Tang X, Xie X, Wang K, Fan H. Ultra-performance liquid chromatography hyphenated with quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for simultaneous determination of necine-core-structure pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria sessiliflora* L. without all corresponding standards. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 365-373, 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas de crotalária e de milho, ao serem submetidas à injúria de herbivoria da lagarta *S. frugiperda*, emitiram uma quantidade significativamente maior de compostos, comparado ao que a planta sem herbivoria libera, nos dois períodos avaliados (0-24 e 24-48 h), com a emissão de 39 compostos para a crotalária e 41 compostos para o milho. Dentre os compostos induzidos pela herbivoria, doze revelaram ser eletrofisiologicamente ativos pelas antenas de fêmeas e de machos de *S. frugiperda*, sendo seis exclusivos para o milho e seis em comum aos extratos das duas plantas.

Os bioensaios comportamentais mostraram que, apesar das fêmeas de *S. frugiperda* ovipositarem preferencialmente nas plantas de milho, elas também ovipositaram nas plantas de crotalária, o que indica que não houve uma repelência das plantas de crotalária às mariposas de *S. frugiperda*. Os bioensaios em túnel de vento mostraram que somente os compostos sintéticos do milho induziram uma resposta comportamental nas mariposas, indicando que os compostos da crotalária não devem ser utilizados pelos adultos de *S. frugiperda*. Isso nos leva a sugerir que as plantas de crotalária, quando utilizadas como plantas de bordadura, não devem interferir na comunicação química entre *S. frugiperda* e plantas de milho. Desta forma, pode-se concluir que as plantas de crotalária não repelem as mariposas, visto que as mariposas ovipositam nelas, e as lagartas, ao emergirem dos ovos e se alimentarem da crotalária, possuem uma baixa taxa de sobrevivência, devido à presença dos compostos não voláteis que são tóxicos aos herbívoros generalistas, como as lagartas de *S. frugiperda*, atuando como defesa direta da planta.

A partir da identificação dos compostos não voláteis da crotalária, pelas duas técnicas de cromatografias líquida e gasosa, foi possível sugerir que os compostos da classe dos alcaloides pirrolizidínicos e dos flavonoides podem estar relacionados aos mecanismos de defesa direta e resistência da planta, conforme evidências na literatura de que diversos compostos pertencentes a estas classes possuem efeitos tóxicos para diferentes espécies de herbívoros.



## PERSPECTIVAS FUTURAS

Ainda não se sabe se os compostos voláteis da crotalária induzidos por herbivoria das lagartas de *S. frugiperda*, podem ser utilizados como sinais de reconhecimento e atração de inimigos naturais dessas pragas. Diante disso, estudos adicionais podem ser conduzidos para avaliar os diferentes aspectos da comunicação química entre as plantas de crotalária e de milho, e entre *S. frugiperda* e seus inimigos naturais. Além disso, bioensaios comportamentais em túnel de vento utilizando as plantas ao invés de septos, poderiam avaliar se há uma diferença nas respostas, em relação às condições físicas e visuais.

Com relação aos compostos que tiveram resposta eletrofisiológica nas antenas de *S. frugiperda*, estudos futuros poderiam avaliar se os compostos individualmente possuem resposta significativa de atração, ou se realmente é necessário o conjunto dos compostos.

Sabendo-se que os alcaloides pirrolizidínicos estão presentes majoritariamente nas sementes de *C. spectabilis*, futuramente poderia ser estudado se essa quantidade diminui com o desenvolvimento da planta. E com relação à quantificação da monocrotalina através da técnica de cromatografia gasosa, poderiam ser realizados testes de solubilidade em diferentes solventes orgânicos que fossem compatíveis à este composto, para posteriormente fazer a quantificação através de uma curva de calibração utilizando o padrão sintético.

Por fim, estudos futuros poderiam avaliar se os compostos não voláteis produzidos por *C. spectabilis* conferem resistência às plantas contra herbívoros e patógenos, e quais desses compostos estariam diretamente associados à menor taxa de sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda*.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. Castro BS, Borges M, Laumann RA, Blassioli-Moraes MC. Compostos voláteis e não voláteis de *Crotalaria spectabilis* e interação com *Spodoptera frugiperda*. In: XXV Encontro do Talento Estudantil, 2020, Brasília-DF. Anais do XXV Encontro do Talento Estudantil, 2020.
2. Castro BS, Sifuentes DN, Correia MV, Brand GD, Laumann RA, Borges M, Blassioli-Moraes MC. Chemical profile of non-volatile compounds from seeds, leaves and roots of *Crotalaria spectabilis*. In: 36th Annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, 2021, South Africa.
3. Castro BS, Borges M, Laumann RA, Correia MV, Blassioli-Moraes MC. Influência dos compostos químicos voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* Roth. nas interações entre o milho (*Zea mays* L.) e sua principal praga, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith). In: XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022, Brasília-DF. Anais do XXVI Encontro do Talento Estudantil, 2022.

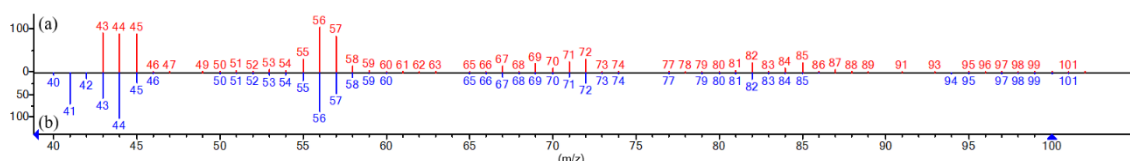
## APÊNDICE I

Espectros de massas de todos os compostos identificados nas análises por GC-MS.

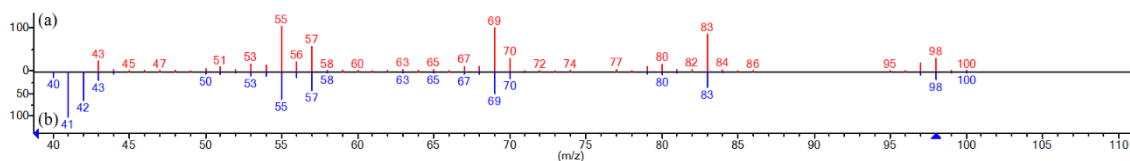
- (a) Padrão de fragmentação do composto na amostra
- (b) Padrão de fragmentação do composto na biblioteca ou do padrão sintético\*

\* Os compostos genisteína tris(TMS), daidzeína bis(TMS) e quercetina penta(TMS) não estavam presentes nos dados da biblioteca, então os padrões de fragmentação desses compostos nas amostras foram comparados com os padrões de fragmentação dos respectivos padrões sintéticos.

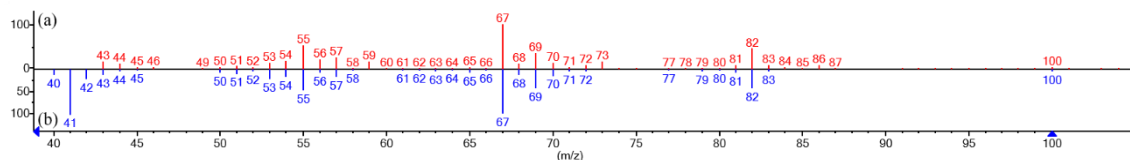
### Hexanal



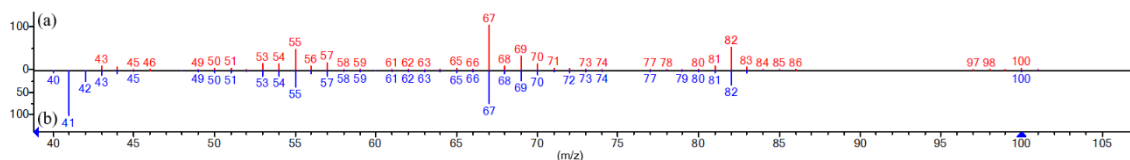
### (E)-2-Hexenal



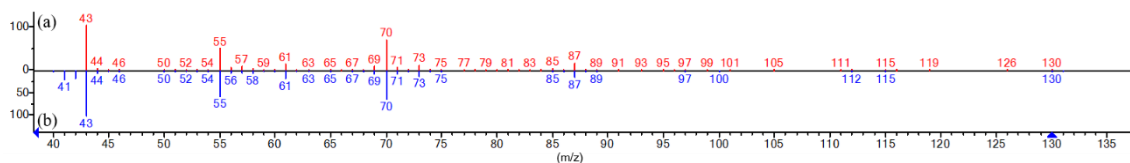
### (E)-3-Hexen-1-ol



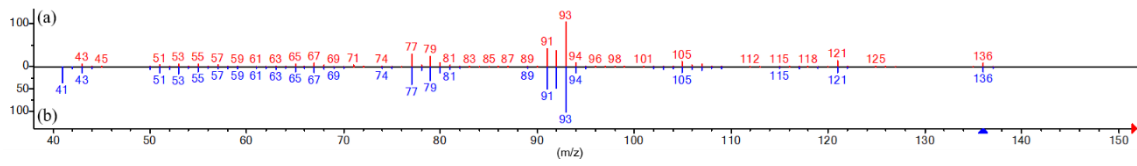
### (Z)-3-Hexen-1-ol



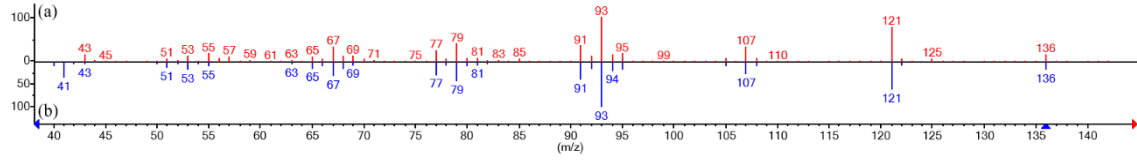
### Acetato de isopentila



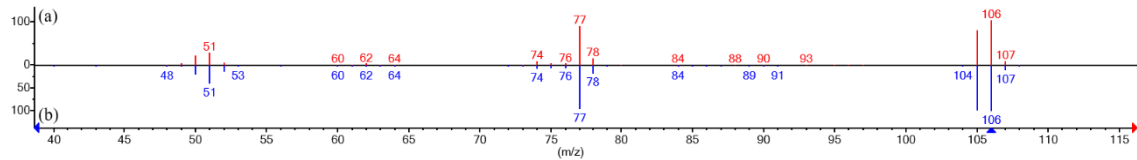
### $\alpha$ -Pino



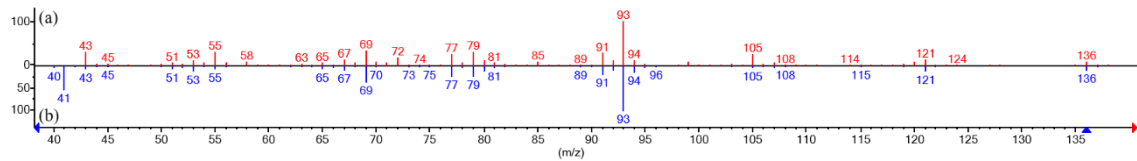
### Canfeno



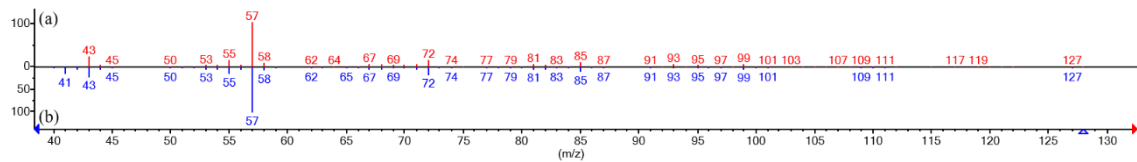
### Benzaldeído



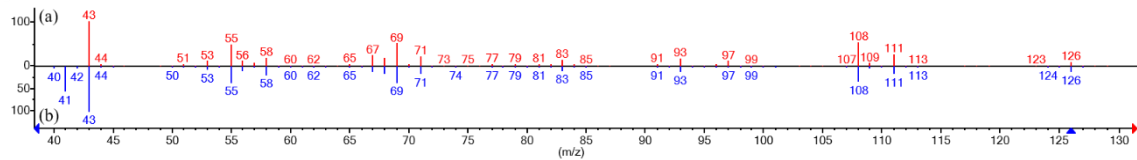
### $\beta$ -Pino



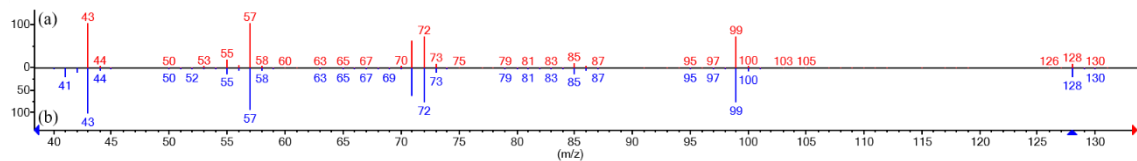
### 1-Octen-3-ol



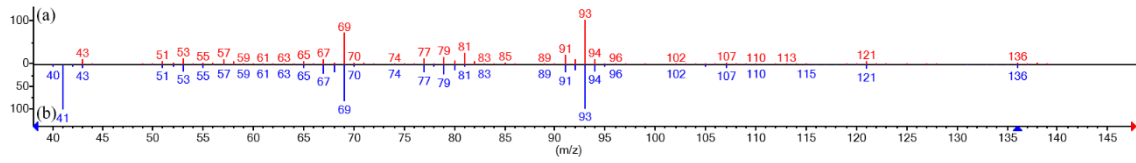
### 6-Metil-5-hepten-2-ona



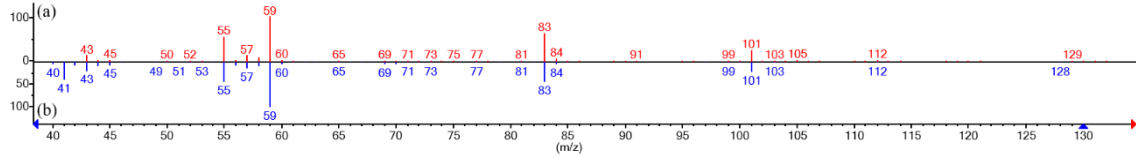
### 3-Octanona



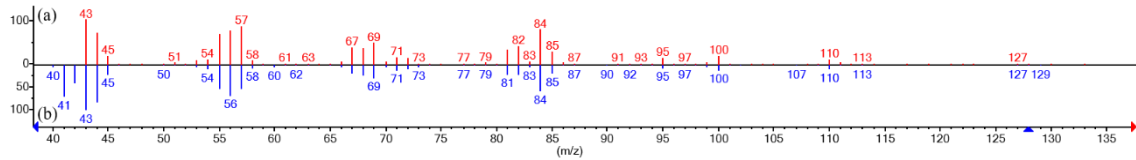
### $\beta$ -Mirceno



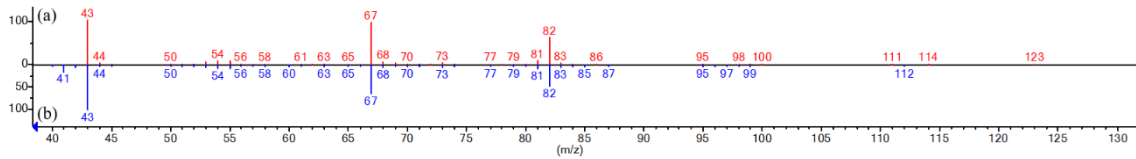
### 3-Octanol



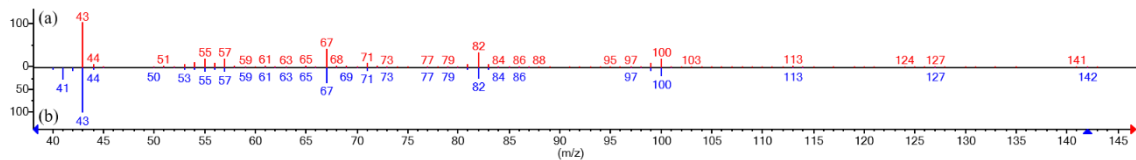
### Octanal



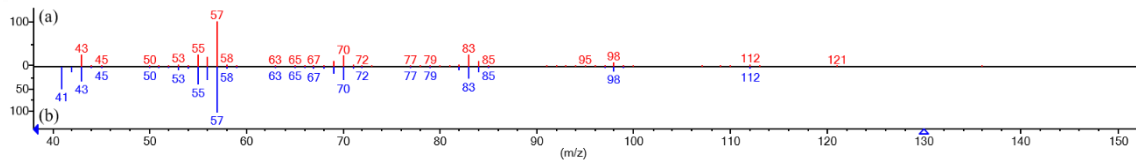
### Acetato de (Z)-3-hexenila



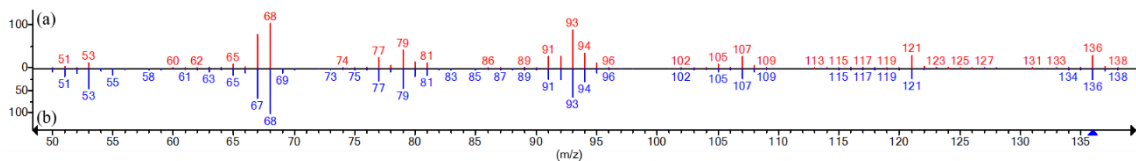
### Acetato de (E)-2-hexenila



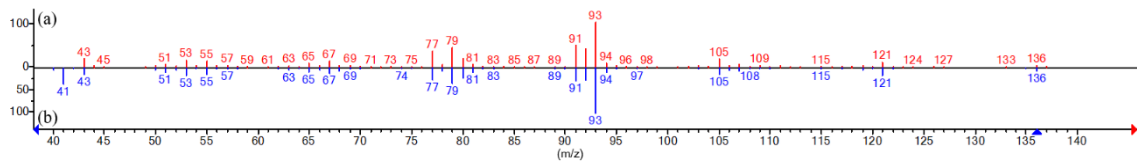
### 2-Etilhexan-1-ol



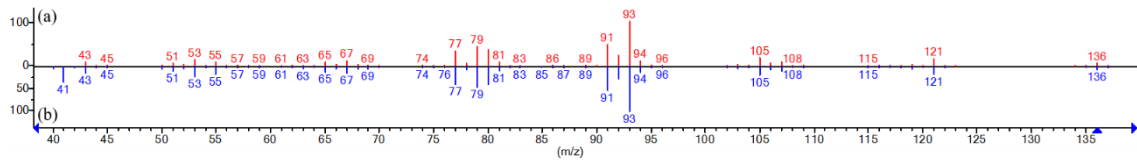
### Limoneno



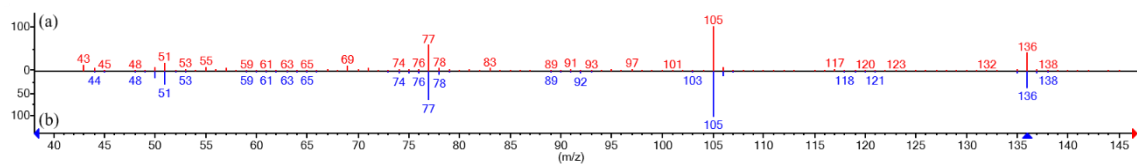
### (Z)- $\beta$ -Ocimeno



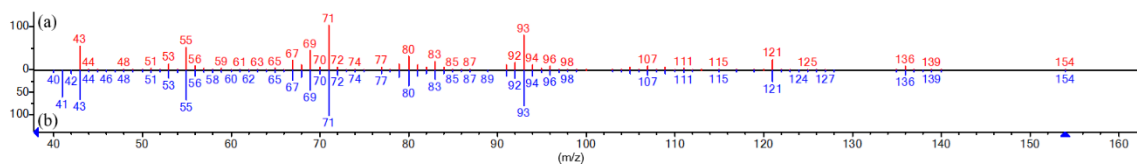
### (E)- $\beta$ -Ocimeno



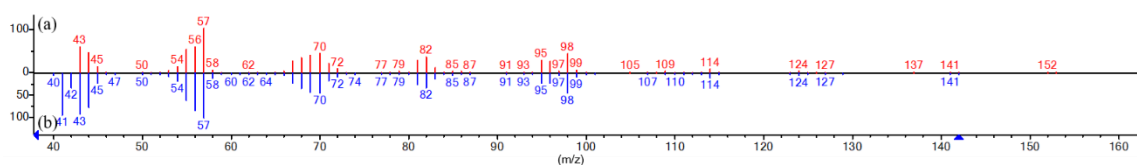
### Benzoato de metila



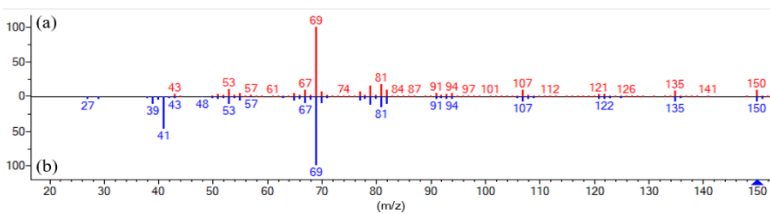
### Linalol



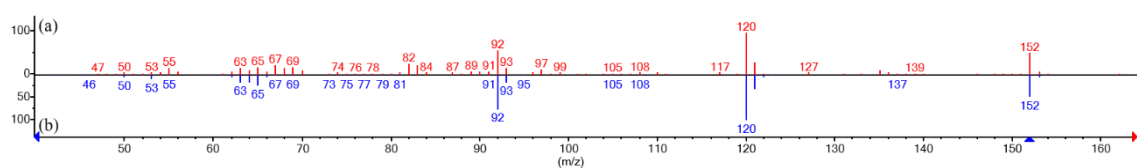
### Nonanal



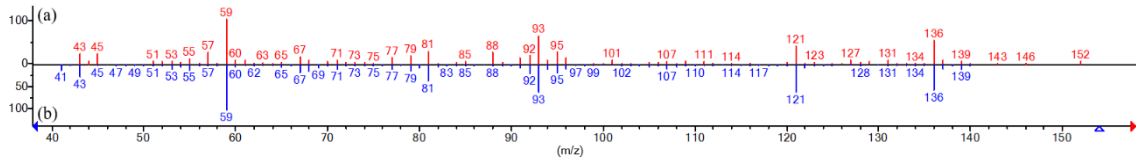
### DMNT



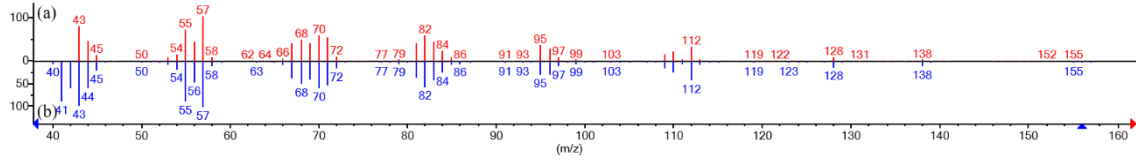
### Salicilato de metila



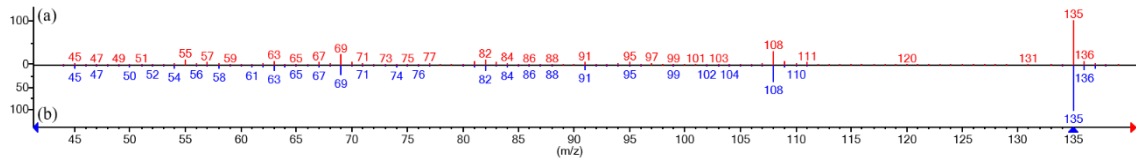
### $\alpha$ -Terpineol



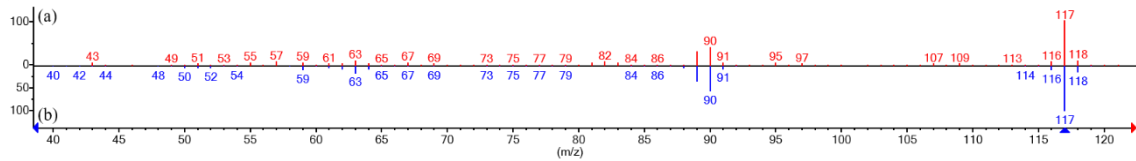
### Decanal



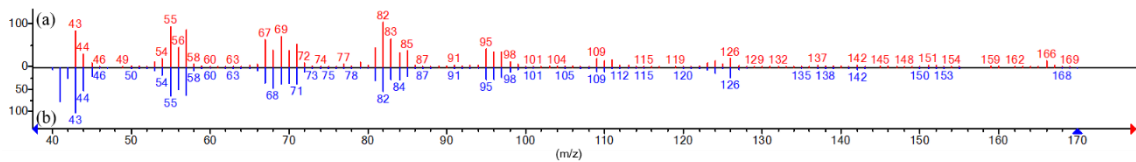
### Benzotiazol



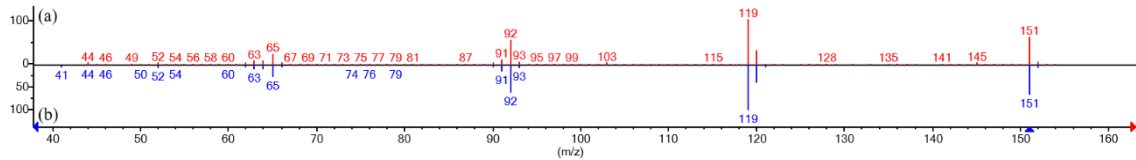
### Indol



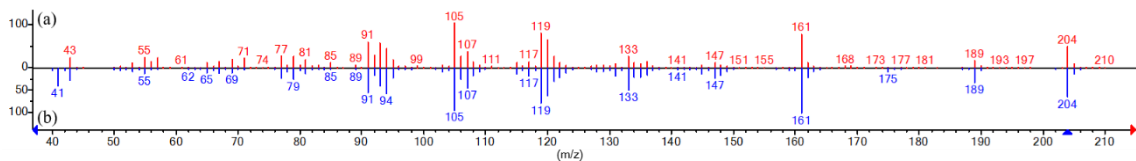
### Undecanal



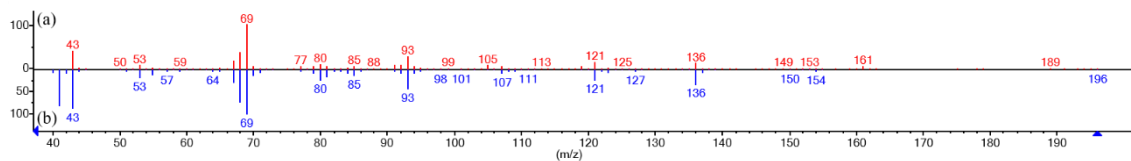
### 2-Aminobenzoato de metila



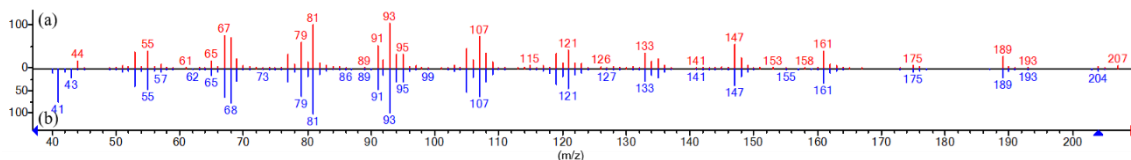
### Ciclosativeno



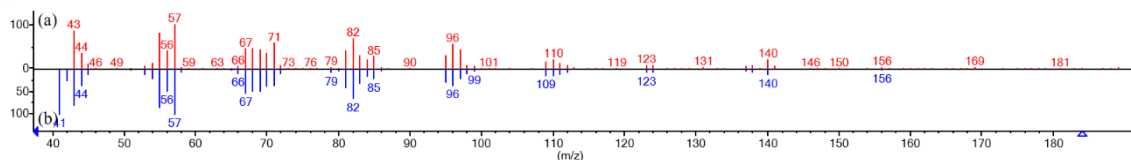
### Acetato de geranila



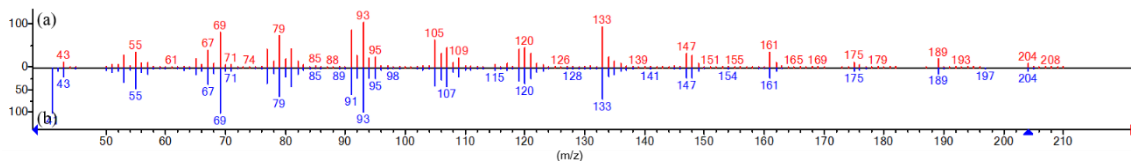
### $\beta$ -Elemeno



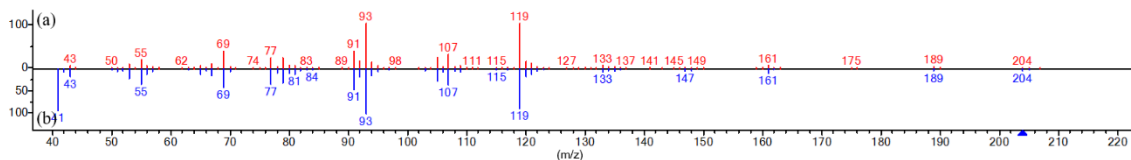
### Dodecanal



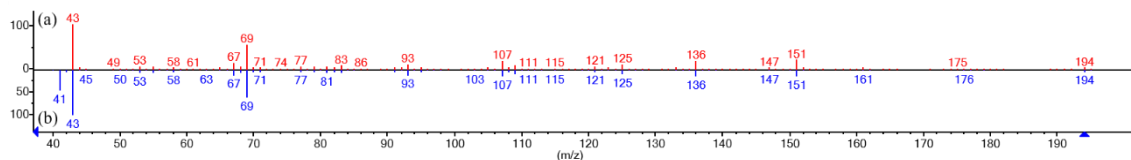
### $\beta$ -Cariofileno



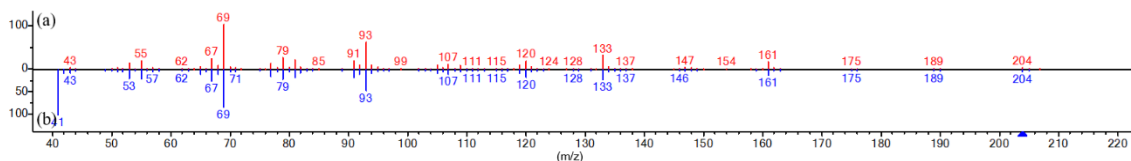
### $\alpha$ -Bergamoteno



### *trans* Geranilacetona

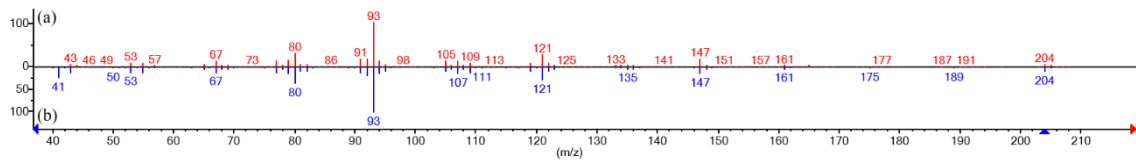


### $\beta$ -Farneseno

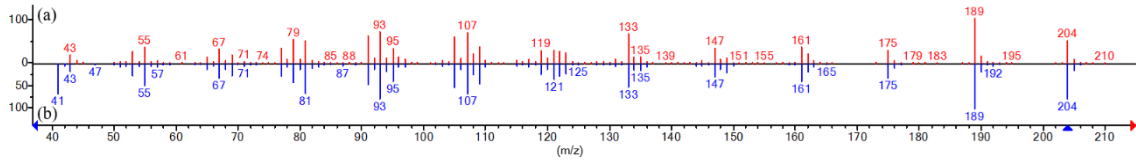




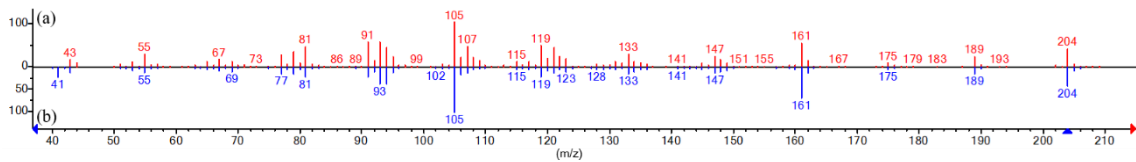
### $\alpha$ -Humuleno



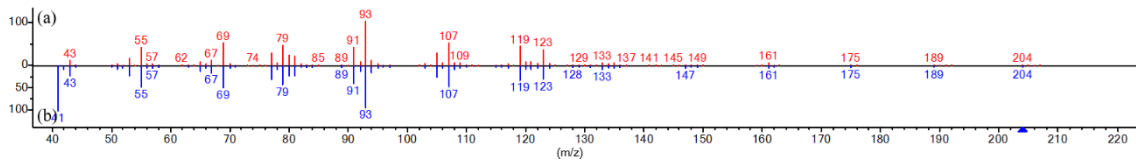
### $\alpha$ -Selineno



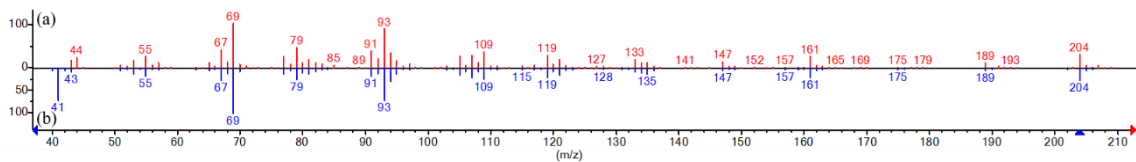
### $\alpha$ -Muroloeno



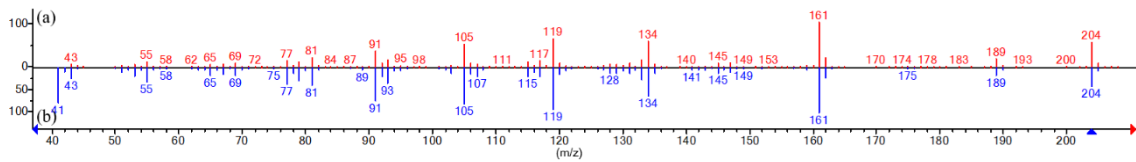
### $\alpha$ -Farneseno



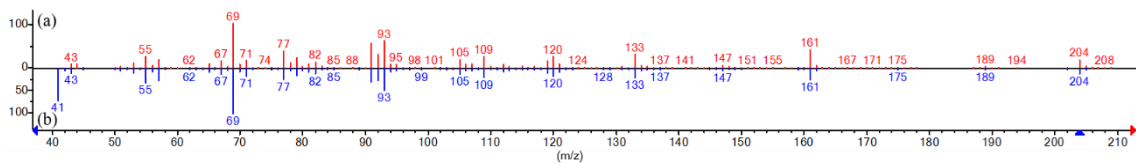
### $\beta$ -Bisaboleno



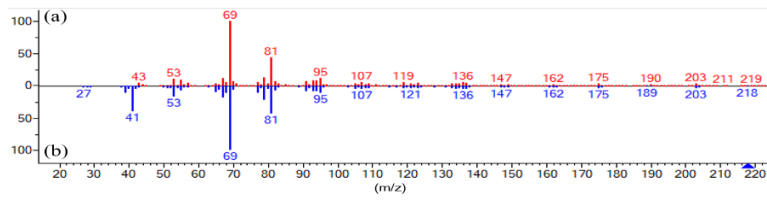
### $\delta$ -Cadineno



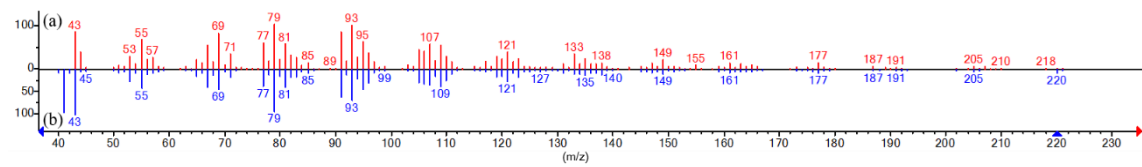
### $\beta$ -Sesquifelandreno



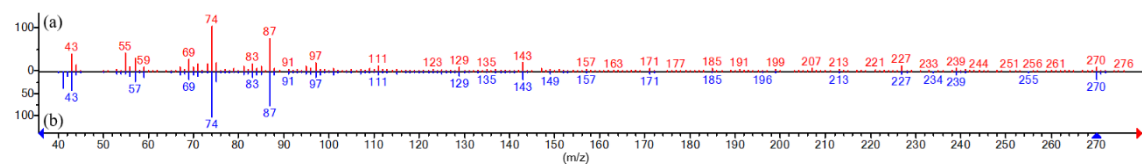
### TMTT



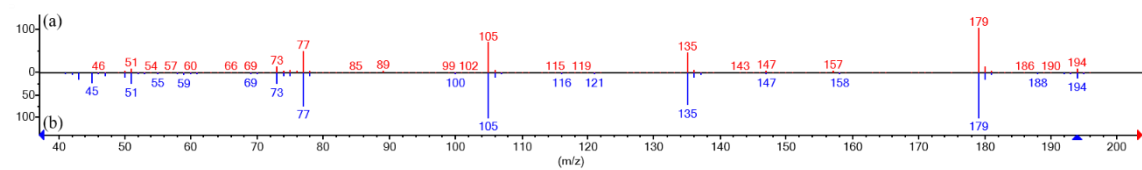
### Cariofileno óxido



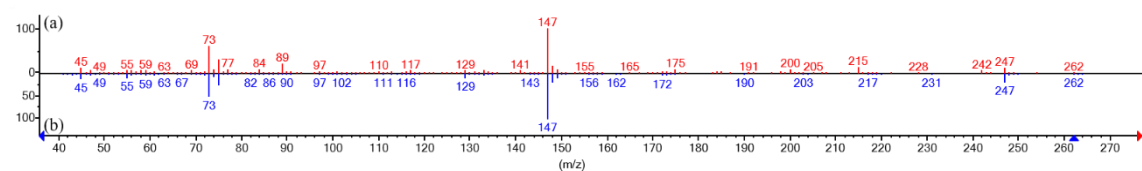
### Palmitato de metila



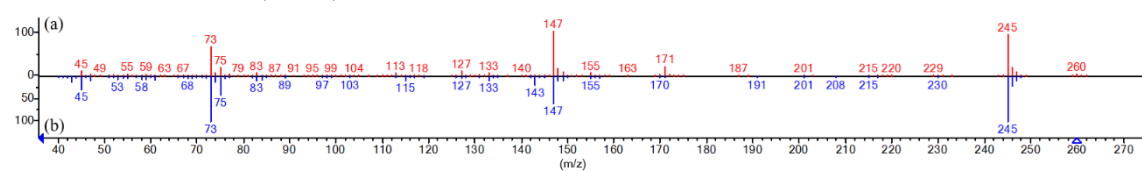
### Ácido benzoico (TMS)



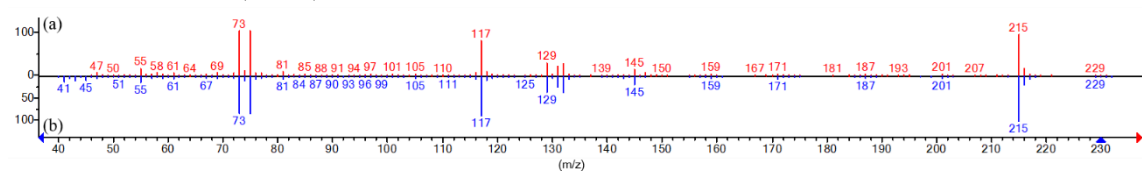
### Ácido succínico bis(TMS)



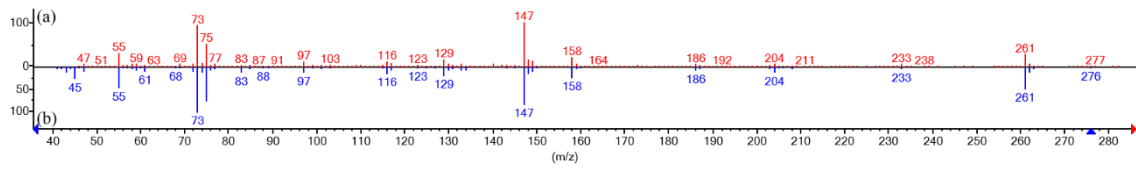
### Ácido fumárico bis(TMS)



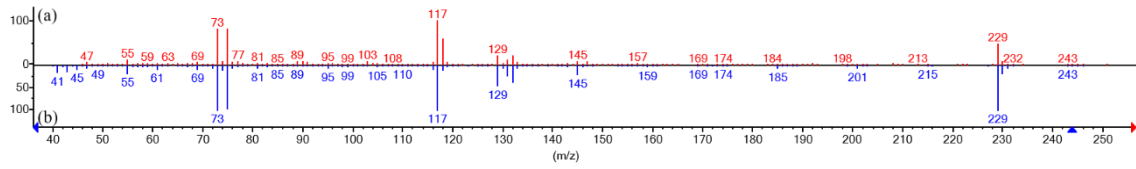
### Ácido nonanoico (TMS)



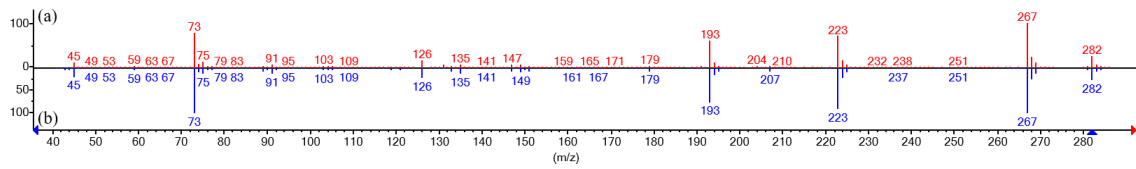
### Ácido glutárico bis(TMS)



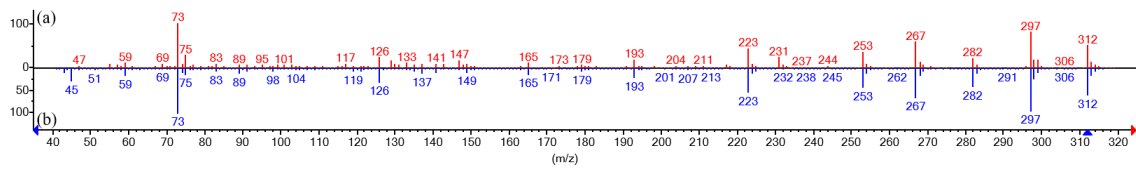
### Ácido decanoico (TMS)



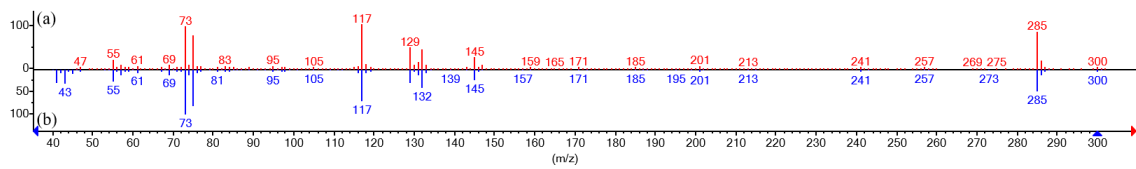
### Ácido *p*-hidroxibenzoico bis(TMS)



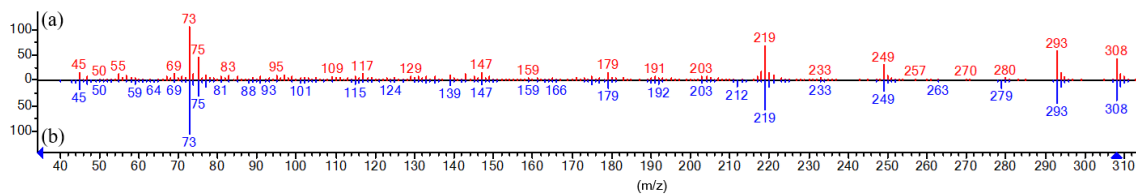
### Ácido vanílico bis(TMS)



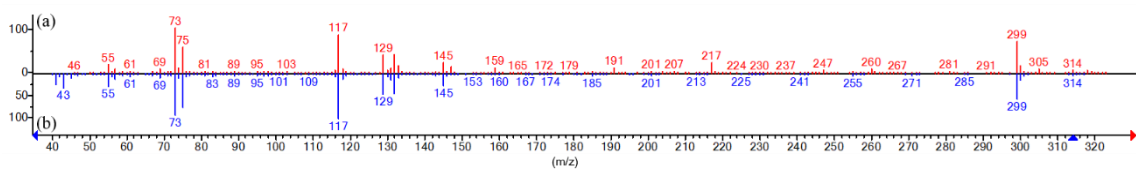
### Ácido tetradecanoico (TMS)



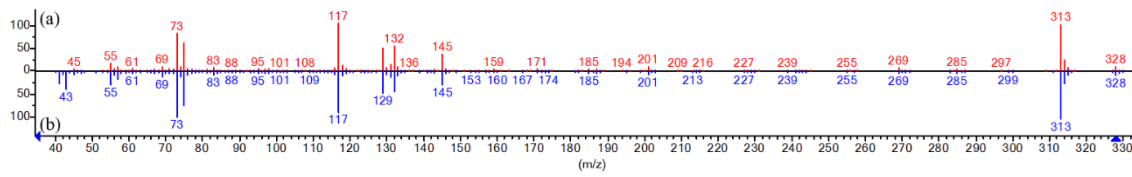
### Ácido *p*-cumárico bis(TMS)



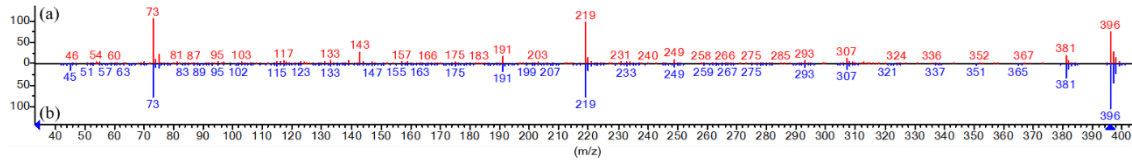
### Ácido pentadecanoico (TMS)



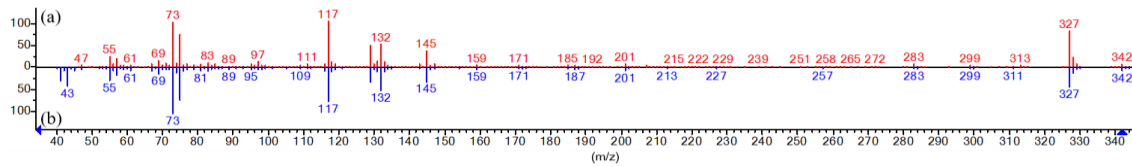
### Ácido palmítico (TMS)



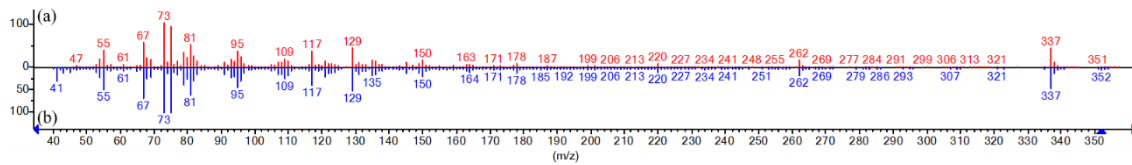
### Ácido cafeico tris(TMS)



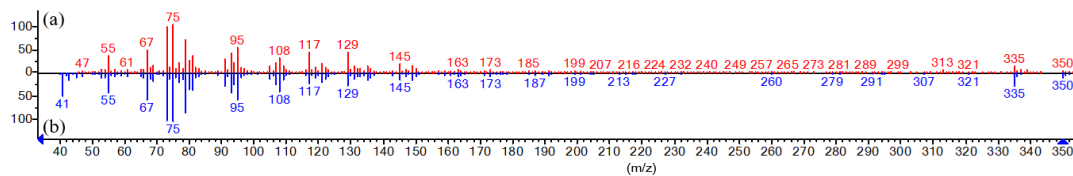
### Ácido heptadecanoico (TMS)



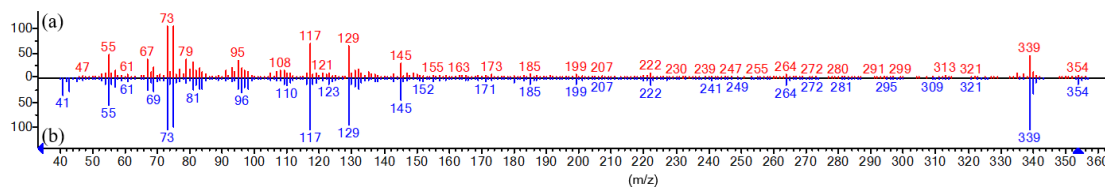
### Ácido linoleico (TMS)



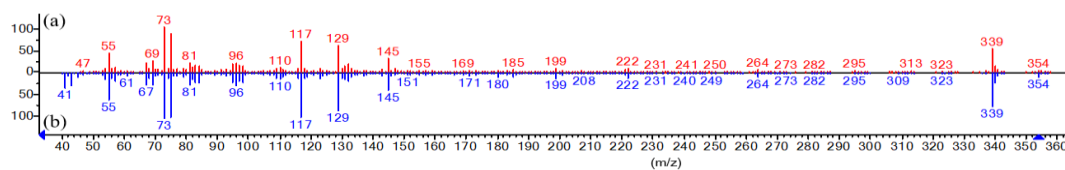
### Ácido $\alpha$ -linolênico (TMS)



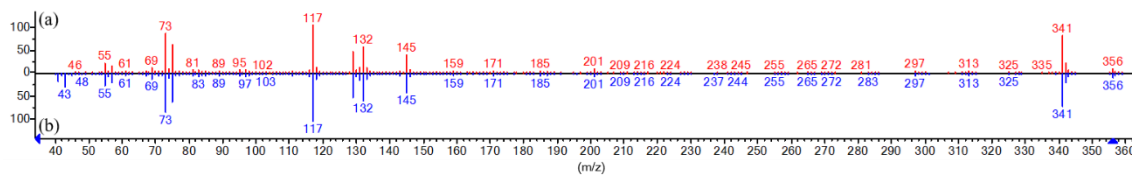
### Ácido *cis*-9-octadecenoico (TMS)



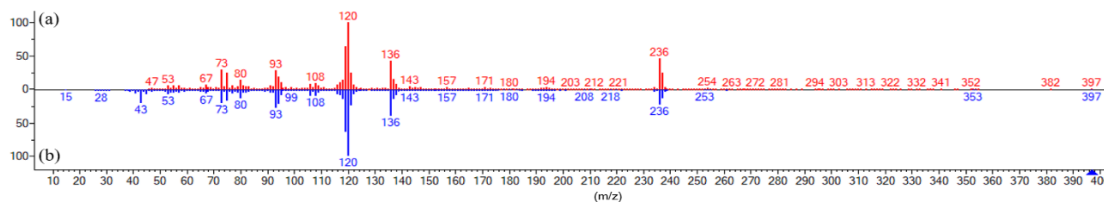
### Ácido *trans*-9-octadecenoico (TMS)



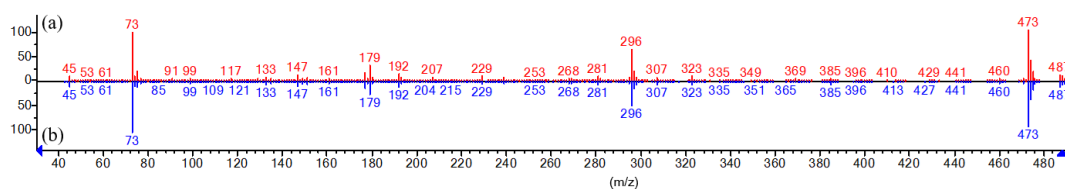
### Ácido esteárico (TMS)



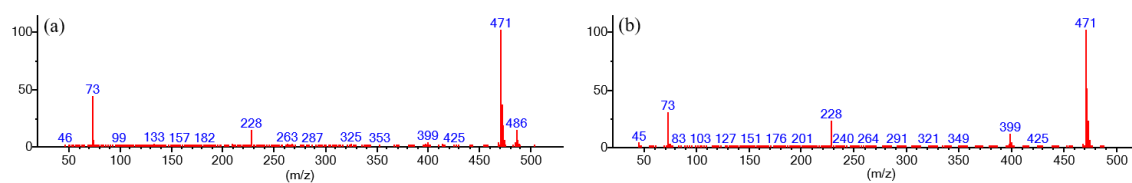
### Monocrotalina (TMS)



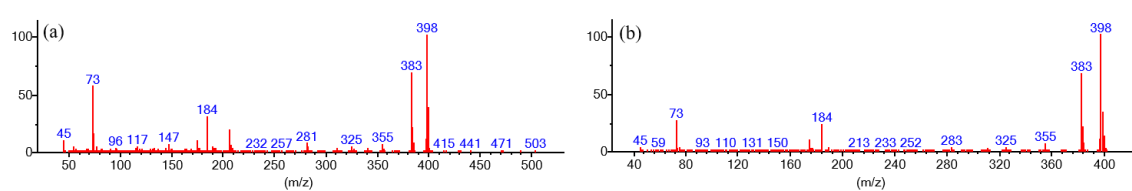
### Naringenina tris(TMS)



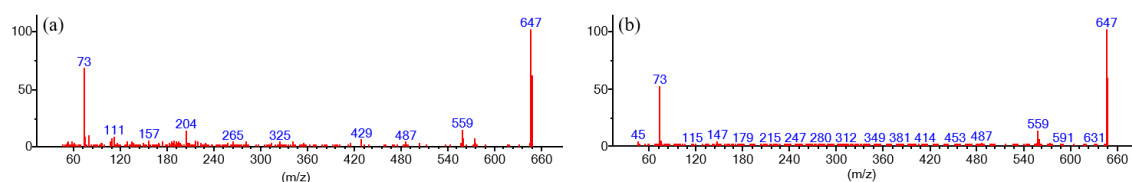
### Genisteína tris(TMS)



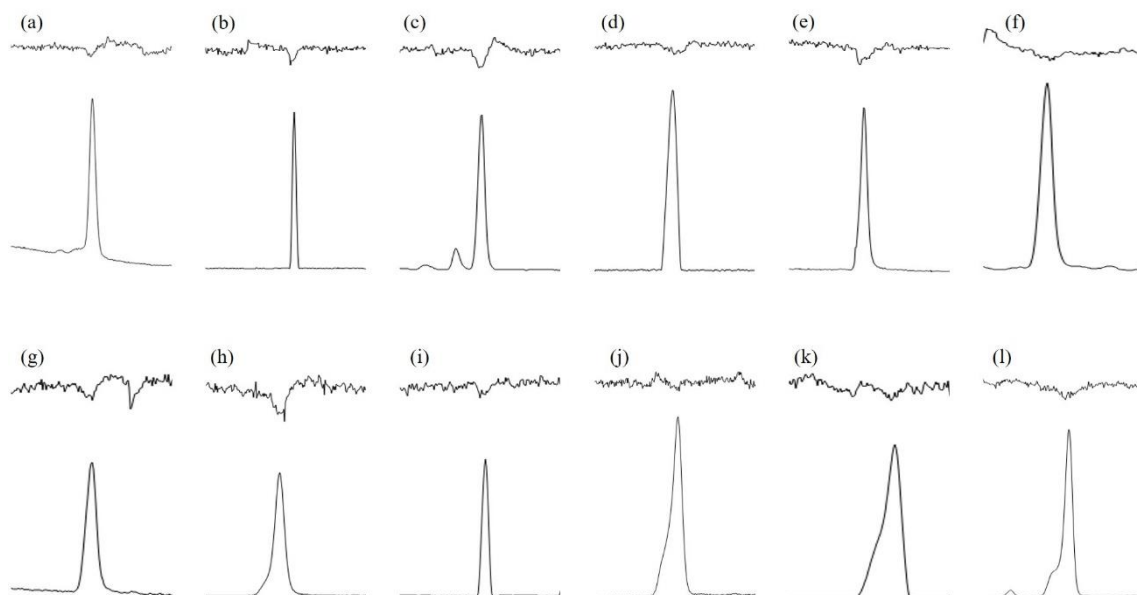
### Daidzeína bis(TMS)



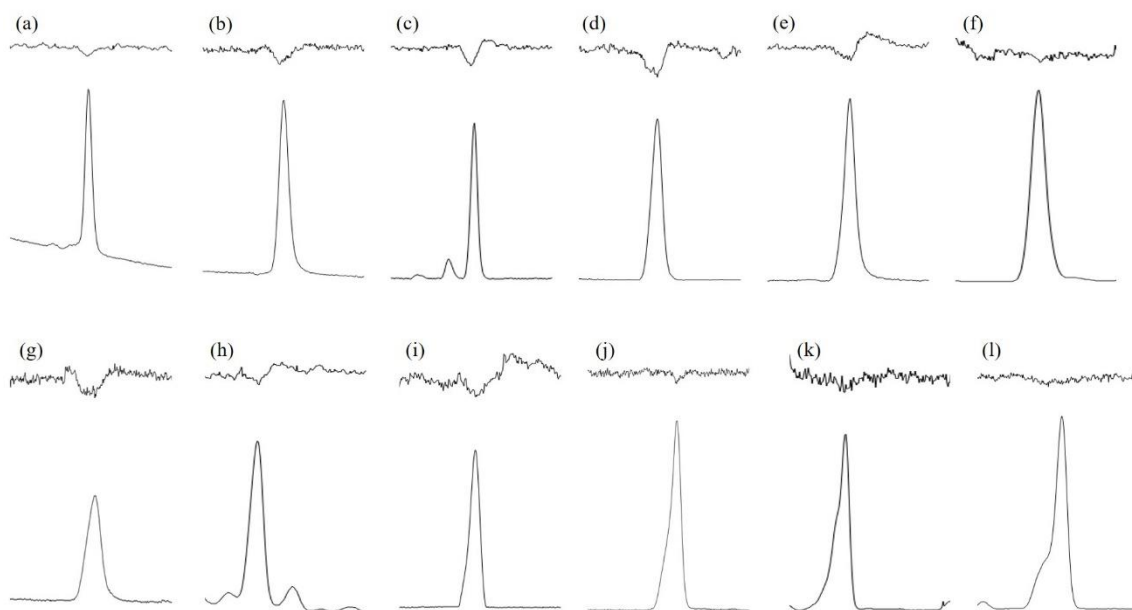
### Quercetina penta(TMS)



## APÊNDICE II

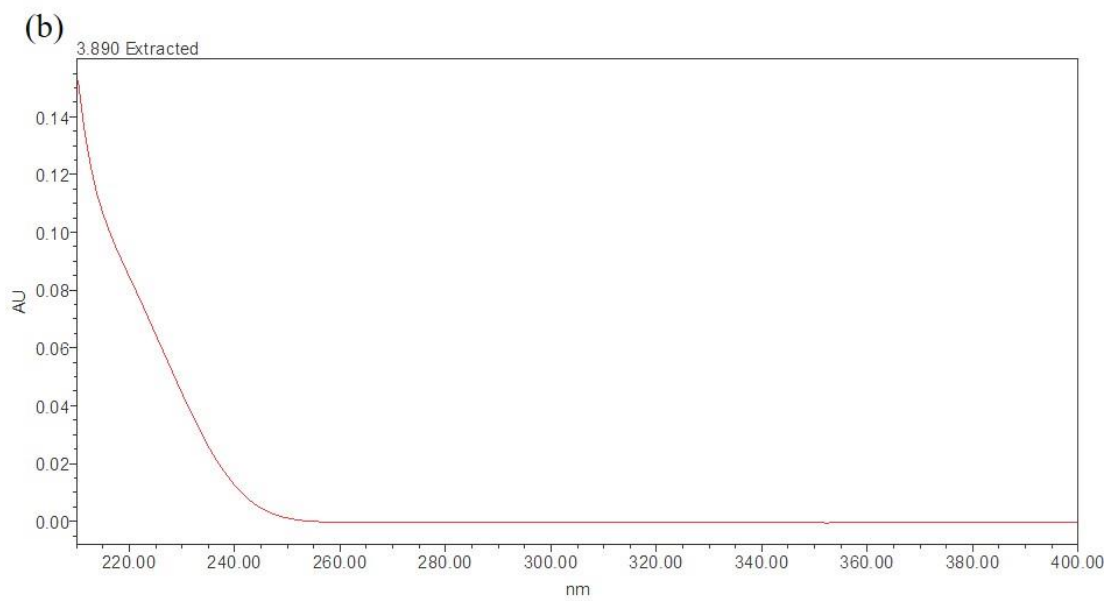
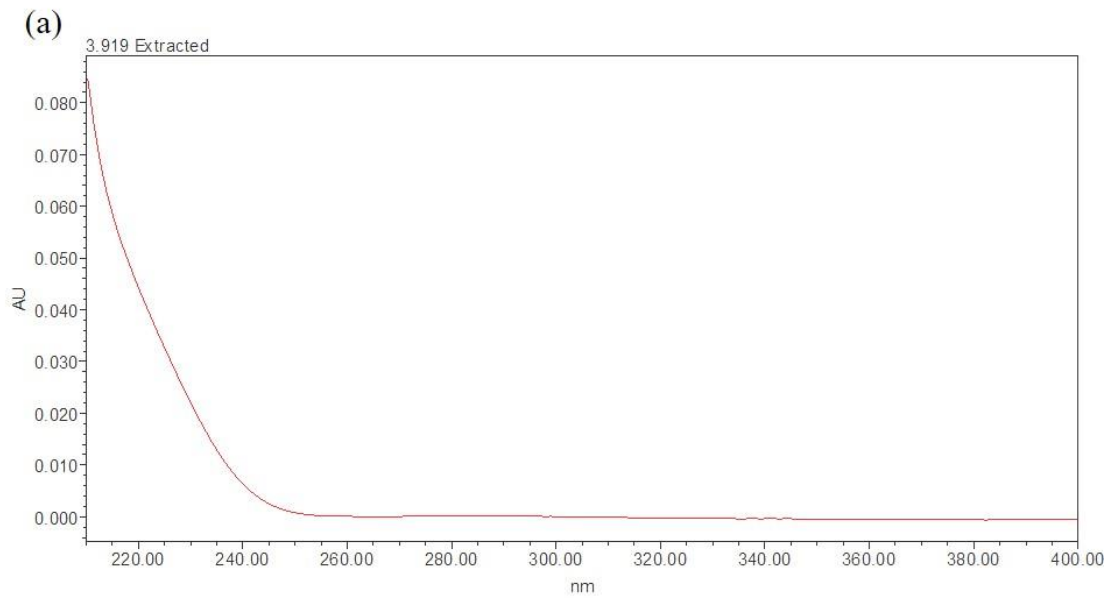


Respostas eletrofisiológicas das antenas de mariposas fêmeas de *Spodoptera frugiperda* obtidas no GC-EAD para os compostos **(a)** *(E)*-2-hexenal; **(b)** acetato de (*Z*)-3-hexenila; **(c)** *(E)*- $\beta$ -ocimeno; **(d)** linalol; **(e)** nonanal; **(f)** DMNT; **(g)** salicilato de metila; **(h)** decanal; **(i)** indol; **(j)** ciclosativeno; **(k)**  $\beta$ -cariofileno; **(l)** TMTT.

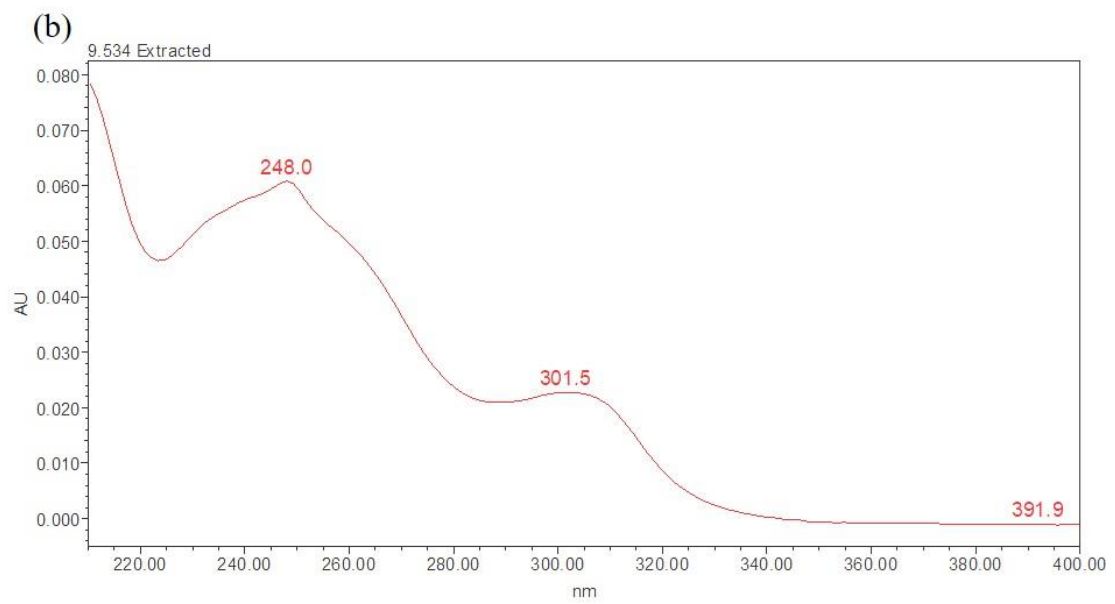
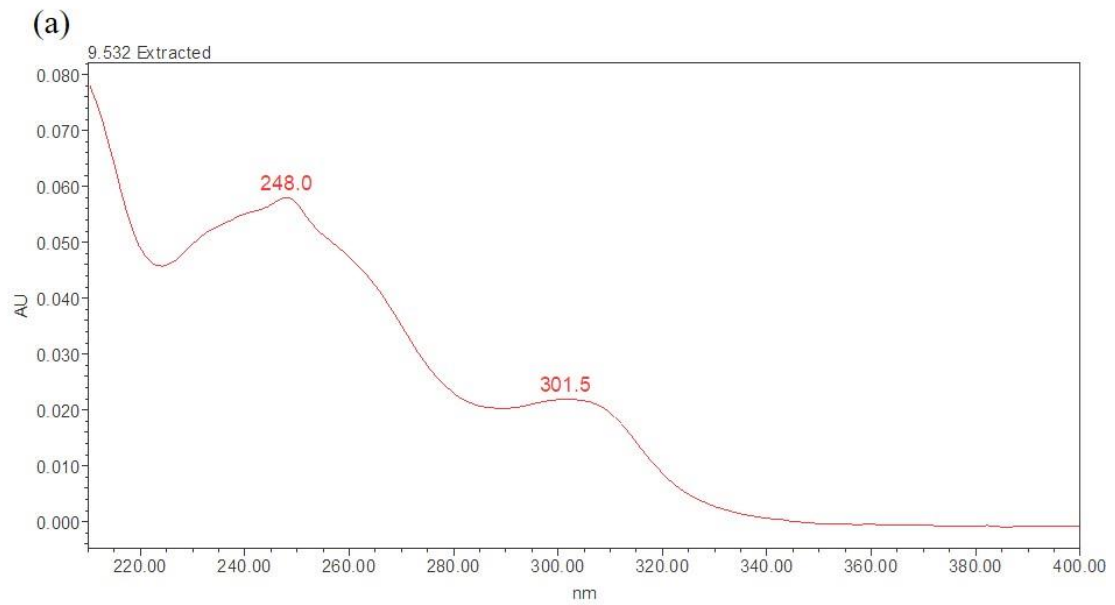


Respostas eletrofisiológicas das antenas de mariposas machos de *Spodoptera frugiperda* obtidas no GC-EAD para os compostos **(a)** *(E)*-2-hexenal; **(b)** acetato de (*Z*)-3-hexenila; **(c)** *(E)*- $\beta$ -ocimeno; **(d)** linalol; **(e)** nonanal; **(f)** DMNT; **(g)** salicilato de metila; **(h)** decanal; **(i)** indol; **(j)** ciclosativeno; **(k)**  $\beta$ -cariofileno; **(l)** TMTT.

### APÊNDICE III

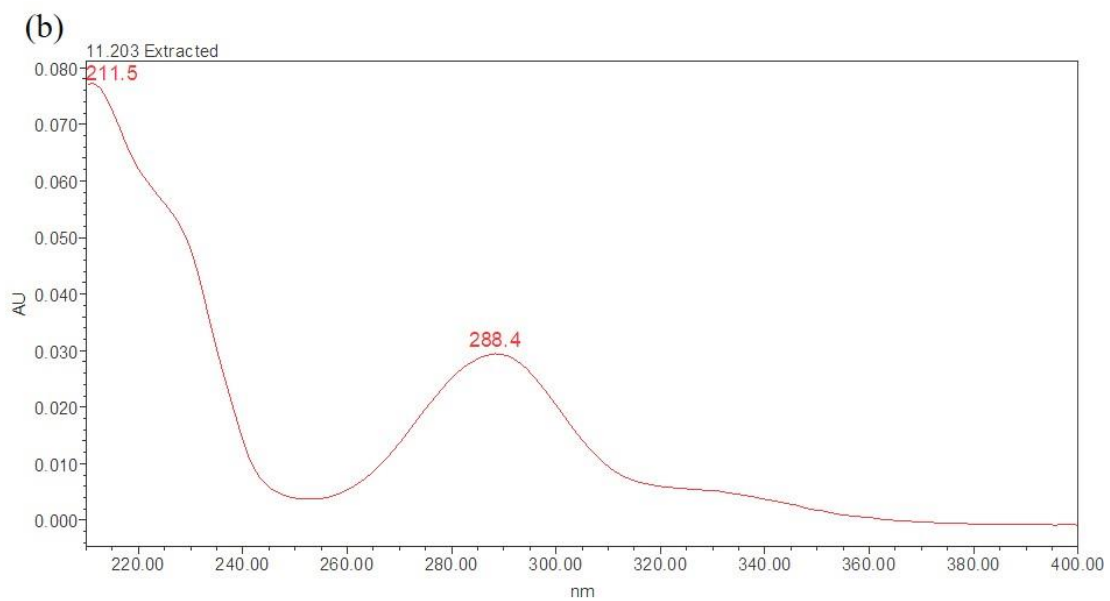
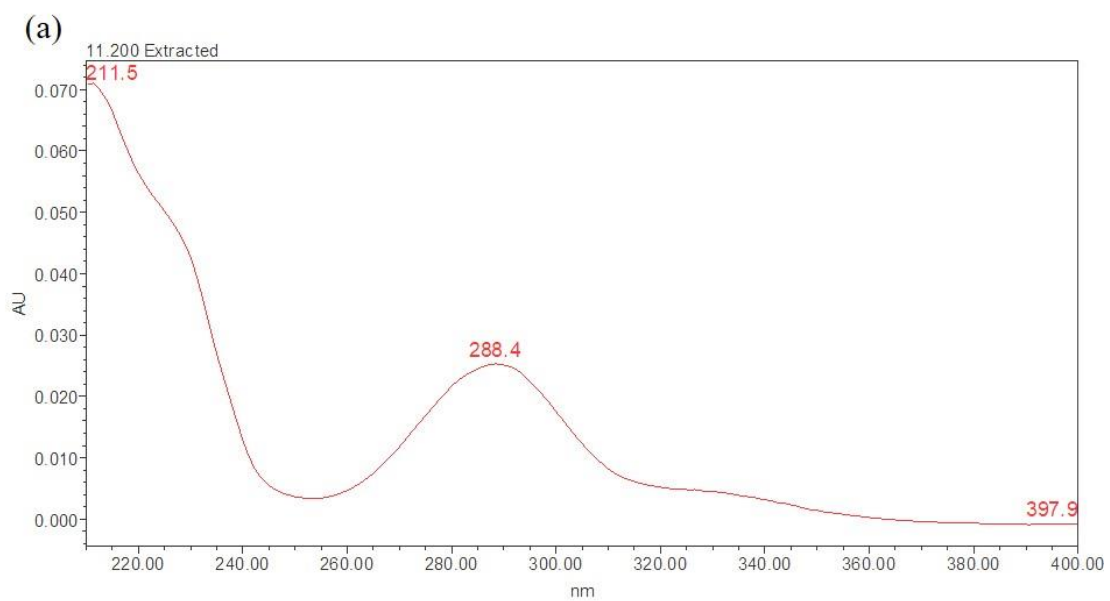


Espectros UV da monocrotalina **(a)** na amostra de sementes e **(b)** padrão sintético.

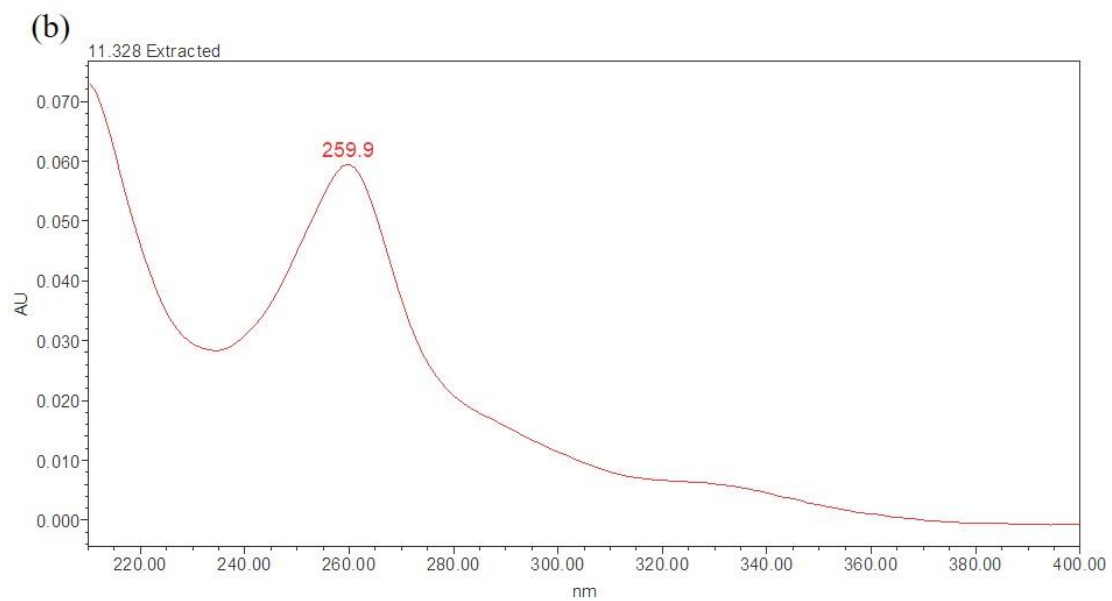
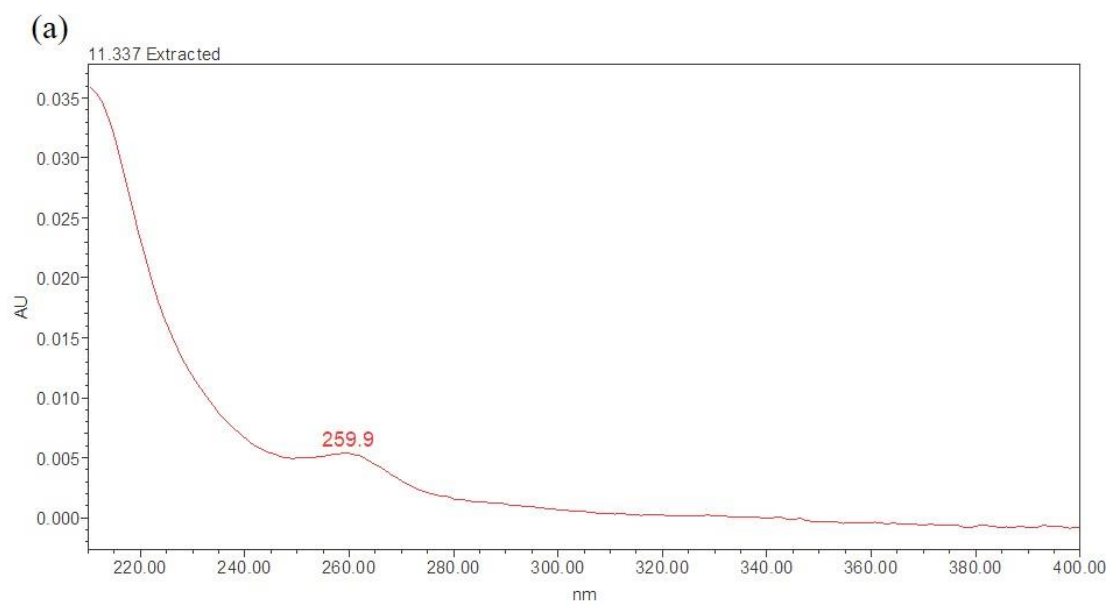


Espectros UV da daidzeína (a) na amostra de raízes e (b) padrão sintético.



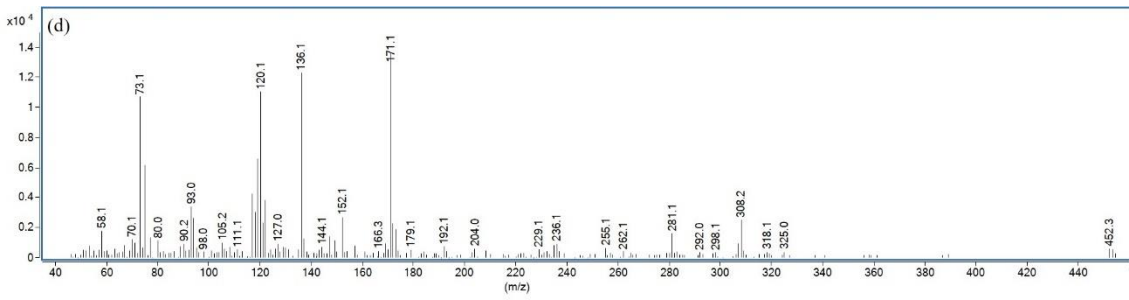
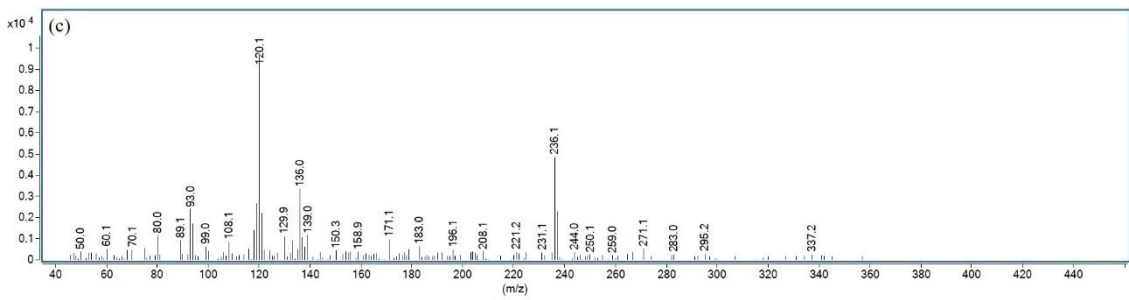
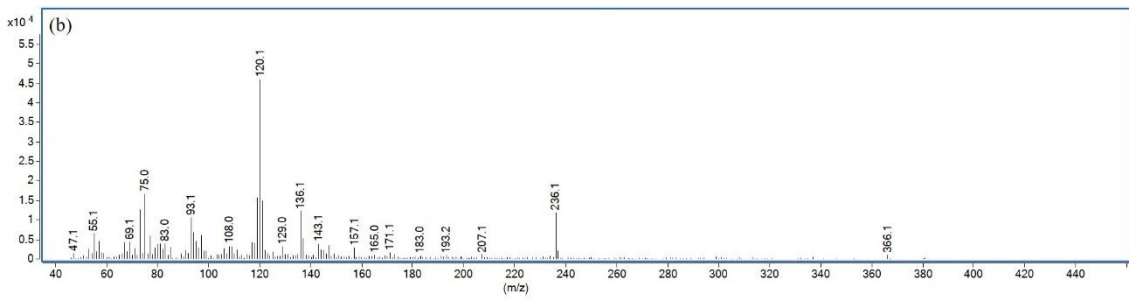
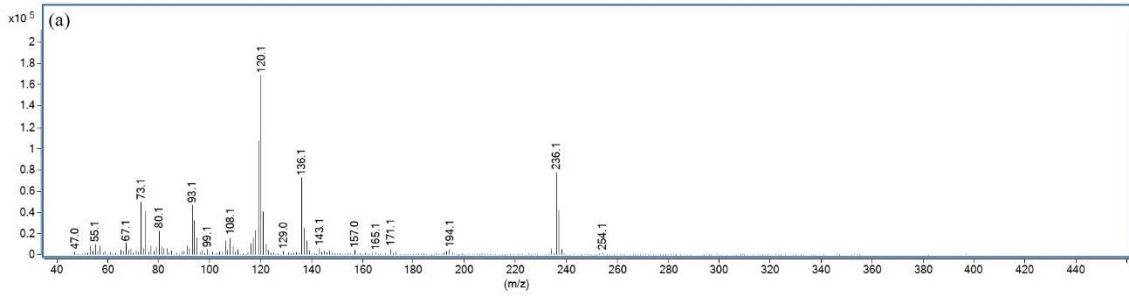


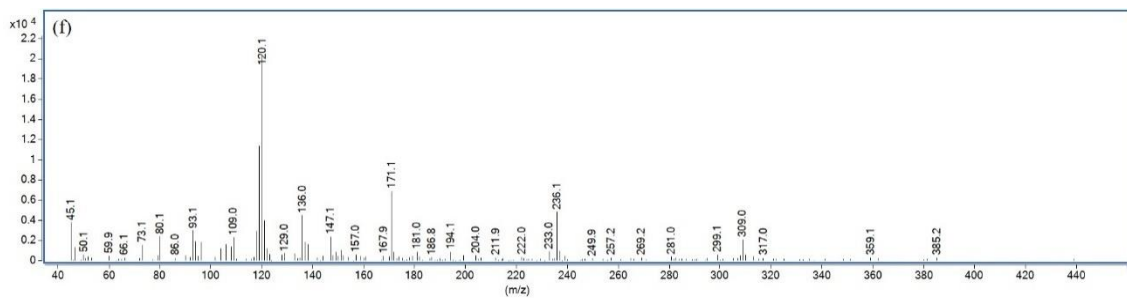
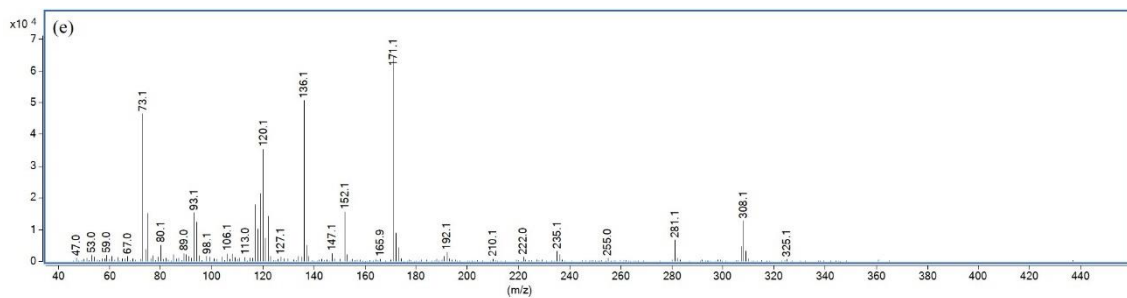
Espectros UV da naringenina **(a)** na amostra de sementes e **(b)** padrão sintético.



Espectros UV da genisteína **(a)** na amostra de raízes e **(b)** padrão sintético.

# APÊNDICE IV





Espectros com os padrões de fragmentação correspondentes aos compostos monocrotalina e aos alcaloides pirrolizidínicos não identificados, com os íons característicos para esta classe, em  $m/z$  93, 120, 136 e 236. **(a)** monocrotalina (TMS); **(b)** composto 20; **(c)** composto 21; **(d)** composto 23; **(e)** composto 24; **(f)** composto 25.

## ANEXO I

Níveis de confiança para anotações dos compostos e respectivas descrições\*

<b>Nível de confiança</b>	<b>Descrição</b>	<b>Requisitos mínimos de dados</b>
Nível 0	Estrutura 3D inequívoca: composto puro isolado, incluindo estereoquímica completa	Determinação da estrutura 3D, seguindo as orientações do produto natural
Nível 1	Estrutura 2D confiável: usa o padrão de referência correspondente ou elucidação completa da estrutura 2D	Pelo menos duas técnicas ortogonais que definem a estrutura 2D com confiança, como MS/MS e TR
Nível 2	Estrutura provável: compatível com dados da literatura ou bancos de dados por evidências diagnósticas	Pelo menos duas informações ortogonais, incluindo evidências que excluam todos os outros candidatos
Nível 3	Estrutura ou classe possível: estrutura mais provável, isômeros possíveis, classe de substância ou <i>match</i> de subestrutura	Um ou vários candidatos possíveis, requer pelo menos uma informação de apoio ao candidato proposto
Nível 4	Desconhecido	Presente na amostra

\*Fonte: Blazenovic et al., 2018.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 13 de dezembro de 2022.

Assinatura do/a discente: Bruna Sartório de Castro

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química

Nome completo: Bruna Sartório de Castro

Título do Trabalho: Influência dos compostos químicos voláteis e não voláteis produzidos por *Crotalaria spectabilis* Roth. nas interações entre o milho e sua principal praga, a lagarta-do-cartucho

Nível:  Mestrado       Doutorado

Orientador/a: Professor Dr. Mauro Vicentini Correia.