

JÉSSICA NUNES DE ASSIS

**DEFESA DA SOJA CONTRA O ATAQUE DE INSETOS-PRAGA: METILAÇÕES EM
FLAVONÓIS GLICOCONJUGADOS DERIVADOS DA RUTINA REDUZEM A
SOBREVIVÊNCIA DA LAGARTA-DA-SOJA *Anticarsia gemmatalis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos

Coorientadores: Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Jodieh Oliveira Santana Varejão

Maria Goreti de Almeida Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A848d
2024

Assis, Jessica Nunes de, 1996-

Defesa da soja contra o ataque de insetos-praga: metilações em flavonóis glicoconjugados derivados da rutina reduzem a sobrevivência da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* / Jessica Nunes de Assis. – Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (62 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.711>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Soja - Resistência a doenças e pragas. 3. Insetos como transmissores de doenças das plantas. 4. Flavonóides. I. Ramos, Humberto Josué de Oliveira, 1969-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 633.342

JÉSSICA NUNES DE ASSIS

**DEFESA DA SOJA CONTRA O ATAQUE DE INSETOS-PRAGA: METILAÇÕES EM
FLAVONÓIS GLICOCONJUGADOS DERIVADOS DA RUTINA REDUZEM A
SOBREVIVÊNCIA DA LAGARTA-DA-SOJA *Anticarsia gemmatalis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 JESSICA NUNES DE ASSIS
Data: 21/10/2024 16:31:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jéssica Nunes de Assis
Autora

Documento assinado digitalmente
 HUMBERTO JOSUE DE OLIVEIRA RAMOS
Data: 18/10/2024 14:33:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Humberto Josué de Oliveira Ramos
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Humberto Josué de Oliveira Ramos pela confiança depositada e aos coorientadores, Prof. Eduardo Vinícius Vieira Varejão, Jodieh Oliveira Santana Varejão e Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira, pelo suporte incansável e pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo deste estudo.

Aos colaboradores que contribuíram significativamente para a realização dos experimentos deste trabalho: Jodieh Oliveira Santana Varejão nos ensaios de síntese orgânica e Halina Schultz no experimento biológico com *A. gemmatilis*.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV, onde grande parte das atividades relacionadas à espectrometria de massas foram desenvolvidas, e ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas (LMCM) da UFOP, pela inestimável contribuição nas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Sou grata à Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Departamento de Química, pelo apoio institucional fundamental, e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro que viabilizaram a realização deste projeto.

Agradeço a todos os colegas do programa de pós-graduação da UFV, em especial às minhas colegas Gabriela Furlani e Cristiane Franco do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química.

À minha psicóloga Josiane Cecília Alves e aos amigos Marina Garofalo Lana, Paula Castro e Rafael Andrade, pelo apoio e companheirismo durante esta jornada.

Aos meus pais, Maria e José, pelo amor incondicional que sempre me fortalece.

À minha irmã Daiane e ao meu sobrinho Cauã, pelo incentivo e motivação constantes.

E, por fim, agradeço a Deus pela minha vida e pela sabedoria que me tem sido concedida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1	12
RESUMO	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
Crescimento de plantas.....	15
Procedimento para extração de flavonoides	15
Análise e separação de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	15
Análises de flavonóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LCMS)	16
Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
Extração e purificação do flavonoide Isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo de folhas de soja.....	17
Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	21
CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2	28
RESUMO	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Reação de metilação da rutina com DMC/DBU	31
Tentativa de remoção do DBU por extração líquido-líquido.....	31
Remoção do DBU por HPLC preparativo	31
Reação de metilação da rutina com iodeto de metila e carbonato de potássio	32
Análises de flavonóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LCMS)	32
Preparo do ensaio biológico com <i>Anticarsia gemmatilis</i>	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
Reações de metilação de compostos fenólicos	34
Reação de metilação com DMC/DBU.....	37
Reação de metilação com iodeto de metila e carbonato de potássio	44
Posição dos grupos <i>O</i> -metilados.....	51
Ensaio biológico com <i>Anticarsia gemmatilis</i>	52
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

ASSIS, Jéssica Nunes, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Defesa da soja contra o ataque de insetos-praga: Metilações em flavonóis glicoconjugados derivados da rutina reduzem a sobrevivência da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*.** Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Coorientadores: Eduardo Vinícius Vieira Varejão, Jodieh Oliveira Santana Varejão e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma das principais culturas agrícolas globais e um componente vital da economia brasileira, servindo como uma importante fonte de proteína vegetal para ração animal e o segundo óleo vegetal mais consumido mundialmente. Contudo, a produção de soja enfrenta desafios significativos devido ao ataque de pragas, como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner), que pode causar danos severos às colheitas. O controle convencional de pragas na soja frequentemente recorre a pesticidas sintéticos, que apresentam riscos ambientais e à saúde humana. Em resposta a esses desafios, estratégias de melhoramento genético têm sido exploradas para desenvolver cultivares de soja resistentes a pragas. Flavonoides, como a rutina e seus derivados metilados, têm mostrado potencial na defesa contra insetos. Este estudo investiga a presença e o papel de flavonoides metilados na resistência da soja a pragas, com foco no genótipo IAC 17, conhecido por sua resistência a insetos. No primeiro capítulo, foi confirmada a presença de isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (narcissin), um flavonol metilado, nas folhas do genótipo IAC 17. A caracterização deste composto foi realizada utilizando espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os resultados indicaram que a presença de flavonoides metilados é uma característica importante para a defesa contra o ataque de insetos-praga, estabelecendo uma nova linha de investigação sobre o mecanismo molecular de resistência das plantas. No segundo capítulo, foram investigados os efeitos da metilação da rutina na sobrevivência de lagartas da soja. Experimentos *in vivo* com dietas artificiais contendo rutina metilada demonstraram que a metilação potencializa os efeitos inseticidas, reduzindo significativamente a sobrevivência das lagartas. A metilação foi realizada utilizando metodologias com iodeto de metila e dimetil carbonato (DMC) como agentes metilantes, com a síntese ajustada para obter formas mono-, di-, tri- e tetra-metiladas da rutina. Os resultados sugerem que a modificação química de flavonoides, como a metilação, pode ser uma estratégia eficaz e sustentável para o controle de pragas, podendo ser implementada por meio da modificação genética das plantas para superexpressão de metilases específicas para flavonoides. Esta abordagem tem o potencial de reduzir a dependência de pesticidas sintéticos e promover práticas agrícolas mais seguras e ambientalmente sustentáveis.

Palavras-chave: soja; flavonoides; resistência a pragas; metilação; controle de pragas; melhoramento genético.

ABSTRACT

ASSIS, Jéssica Nunes, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Defense of soybean against insect pests: Methylation of glycoconjugated flavonoids derived from rutin reduces survival of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*.** Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Coorientadores: Eduardo Vinícius Vieira Varejão, Jodieh Oliveira Santana Varejão e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Soybean *Glycine max* (L.) Merrill is one of the major global agricultural crops and a vital component of the Brazilian economy, serving as a significant source of plant protein for animal feed and the second most consumed vegetable oil worldwide. However, soybean production faces significant challenges due to pest attacks, such as the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner), which can cause severe crop damage. Conventional pest control in soybeans often relies on synthetic pesticides, posing environmental and human health risks. In response to these challenges, genetic improvement strategies have been explored to develop soybean cultivars resistant to pests. Flavonoids, such as rutin and its methylated derivatives, have shown potential in defending against insects. This study investigated the presence and role of methylated flavonoids in soybean pest resistance, focusing on the IAC 17 genotype, known for its insect resistance. In the first chapter, the presence of isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (narcissin), a methylated flavonol, was confirmed in the leaves of the IAC 17 genotype. Characterization of this compound was performed using mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Results indicated that the presence of methylated flavonoids is an important feature for defense against insect pests, establishing a new line of research into the molecular mechanism of plant resistance. In the second chapter, the effects of rutin methylation on caterpillar survival were investigated. *In vivo* experiments using artificial diets containing methylated rutin showed that methylation enhances insecticidal effects, significantly reducing larval survival. Methylation was carried out using methodologies involving methyl iodide and dimethyl carbonate (DMC) as methylating agents, with synthesis adjusted to obtain mono-, di-, tri-, and tetra-methylated forms of rutin. The results suggest that chemical modification of flavonoids, such as methylation, could be an effective and sustainable strategy for pest control, potentially implemented through genetic modification of plants to overexpress specific flavonoid methylases. This approach has the potential to reduce dependency on synthetic pesticides and promote safer and environmentally sustainable agricultural practices.

INTRODUÇÃO GERAL

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma das culturas agrícolas mais importantes no mundo e possui grande relevância econômica no Brasil. Destaca-se como a principal fonte de proteína vegetal usada na produção de proteína animal, além de ser o segundo óleo mais consumido globalmente, atrás apenas do óleo de palma (Silva et al., 2021). Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a maior parte da soja produzida no país é destinada ao esmagamento, gerando farelo e óleo de soja. O farelo de soja é a principal matéria-prima para a fabricação de ração animal, essencial para a indústria pecuária. Além disso, o óleo de soja é amplamente utilizado na culinária e na indústria alimentícia, bem como na produção de biodiesel, contribuindo para a matriz energética renovável do país. Na safra de 2019/20, o Brasil atingiu um recorde histórico de 257 milhões de toneladas de grãos, com mais de 120 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2020). Este recorde reforça a posição do Brasil como um dos maiores produtores e exportadores de soja do mundo, impulsionando a economia nacional e gerando empregos em várias regiões.

Todavia, a cultura da soja enfrenta desafios significativos, como o ataque de diversas espécies de insetos, incluindo a *Anticarsia gemmatilis* Hübner (1816) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-da-soja. No Brasil, essa espécie é uma das lagartas desfolhadoras mais comuns e, quando não manejada corretamente, pode causar danos severos à produtividade ou até mesmo levar à perda total da colheita (Moscardi et al., 2012). A principal forma de controle de pragas na soja tem sido a aplicação de compostos puramente sintéticos e altamente tóxicos. No entanto, o uso inadequado e prolongado desses pesticidas causa danos irreparáveis ao ecossistema, como assoreamento e contaminação de corpos hídricos. Além disso, a aplicação indiscriminada desses produtos pode levar ao desenvolvimento de resistência por parte dos insetos, exigindo doses cada vez maiores ou a utilização de novos pesticidas, o que aumenta os custos de produção e os riscos ambientais. Outro problema associado ao uso excessivo de agrotóxicos é a ameaça à saúde humana, pois resíduos desses produtos podem permanecer nos alimentos e na água, afetando as populações locais e os consumidores (Hoffmann-Campo et al., 2000).

Uma estratégia alternativa ou complementar ao uso de inseticidas é o melhoramento genético das plantas para torná-las mais resistentes a insetos-praga. Conhecer características específicas das plantas permite entender a natureza genética dessa resistência, seu modo de ação preciso e aprimorar os métodos de seleção e procedimentos de melhoramento (War et al., 2012). O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) foi pioneiro no Brasil ao incluir em seu programa de melhoramento de soja linhas

de pesquisa focadas na resistência a percevejos e outros insetos. O IAC já liberou cinco cultivares resistentes a insetos: IAC 100, IAC 17, IAC 19, IAC 23 e IAC 24, que demonstraram resistência a insetos como a mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e lagartas desfolhadoras como *Anticarsia gemmatilis* (Fugi et al., 2005).

A reação das plantas ao dano causado por pragas envolve a síntese de uma variedade de metabólitos secundários, que respondem a diferentes fatores de estresse ambiental biótico e abiótico. Estes compostos, embora não diretamente envolvidos nos processos metabólicos de fotossíntese, respiração e crescimento, oferecem vantagens para a sobrevivência e desenvolvimento da planta (Tiwari & Rana, 2015). Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. Estudando sua ação como antioxidante, pesquisas envolvendo não só os compostos flavonoídicos, como também os seus precursores biossintéticos foram bastante desenvolvidas. O flavonoide rutina (quercetina-3-rutinosídeo) é comumente encontrado em genótipos de soja IAC 17 e IAC 24 e tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento de plantas como fonte de resistência a insetos. Esse composto produz efeitos tóxicos e antinutricionais em muitos insetos desfolhadores, como a *A. gemmatilis* (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024).

Ademais, outro flavonol com estrutura muito semelhante à rutina foi recentemente detectado em elevadas concentrações nas folhas do genótipo IAC 17. Este composto foi putativamente identificado como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Narcissin) (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024). A única diferença estrutural entre a rutina e o narcissin é a presença de um grupo metil na posição 3', o que sugere uma metilação específica nesta posição. Precursores biossintéticos desse composto, como isoramnetina e isoramnetina 3-*O*-glicosídeo, foram também observados nos genótipos de soja IAC 100 e IAC 24, sugerindo uma síntese constitutiva de flavonóis metilados (Pinheiro et al., 2024). A presença consistente desses compostos em diferentes genótipos indica que a via metabólica responsável pela metilação é ativa e regulada de maneira constitutiva, desempenhando um papel crucial na defesa das plantas contra insetos. Assim, investigar a via responsável pela metilação desses compostos é essencial para compreender os mecanismos de resistência dos genótipos de soja ao ataque de pragas.

Nesse sentido, a pesquisa de compostos bioativos naturais e suas modificações químicas representa uma abordagem promissora para o controle sustentável de pragas na agricultura moderna. A modificação química de flavonoides, como a metilação, pode alterar suas propriedades biológicas, possivelmente aumentando sua eficácia como agentes de controle de pragas. A metilação pode ser

realizada utilizando diferentes agentes metilantes e catalisadores. Um método eficiente e ecológico envolve o uso de dimetil carbonato (DMC), que é conhecido por sua baixa toxicidade para humanos e para o meio ambiente. Nesse processo, o DMC atua como agente metilante, enquanto o diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) é utilizado como catalisador, o que não apenas reduz o tempo de reação, mas também minimiza reações secundárias indesejadas, como a carboximetilação (Straßmann et al., 2021). Além disso, DBU tem sido amplamente utilizado em várias transformações orgânicas devido às suas propriedades básicas aprimoradas e alta estabilidade térmica e mecânica, facilitando uma ampla gama de reações, incluindo ciclizações, eliminações e reações de esterificação (Boddu et al., 2022).

Por outro lado, a metilação com iodeto de metila é uma técnica clássica na síntese orgânica, onde este reagente funciona como um agente metilante, reagindo seletivamente com nucleófilos como álcoois e aminas para introduzir grupos metila. Em certas reações, o carbonato de potássio pode ser utilizado como base para promover a formação do nucleófilo necessário para a reação de metilação, aumentando assim a eficiência do processo (Kozłowska et al., 2017). Essa abordagem é reconhecida por sua eficiência e seletividade, proporcionando uma rota direta e controlada para a metilação de compostos orgânicos. A simplicidade e a eficácia do iodeto de metila em diversas reações de metilação o tornam uma escolha popular em sínteses orgânicas, especialmente quando se busca alta reatividade e controle sobre os produtos finais (Tatsuzaki et al., 2018). Essas metodologias diversificadas para a metilação de flavonoides têm potencial para desenvolver novos compostos com aplicações promissoras no controle biológico de insetos-praga.

No primeiro capítulo deste estudo, purificamos o flavonoide conhecido como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Narcissin) das folhas do genótipo resistente a insetos IAC 17. Como não há relatos anteriores na literatura sobre essa via biossintética no genótipo IAC 17, o objetivo foi isolar e caracterizar a estrutura molecular deste composto utilizando técnicas avançadas como espectrometria de massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Este estudo amplia significativamente o conhecimento sobre os compostos presentes no genótipo IAC 17 e estabelece uma base sólida para futuras pesquisas sobre o papel dos flavonoides na resistência a pragas. A análise detalhada dessas estruturas e suas propriedades pode revelar novas estratégias de defesa naturais que podem ser integradas a programas de melhoramento genético, reduzindo a necessidade de pesticidas químicos e promovendo uma agricultura mais sustentável.

No segundo capítulo, investigamos os efeitos da metilação da rutina na sobrevivência de lagartas da soja, conduzindo experimentos *in vivo* com dietas artificiais que continham tanto rutina não

modificada quanto compostos metilados derivados dela. Monitoramos cuidadosamente a sobrevivência das lagartas ao longo de seu ciclo biológico, avaliando parâmetros como taxa de mortalidade, desenvolvimento larval e peso das pupas. Nossos resultados indicam que a metilação da rutina teve um impacto significativo na eficácia do composto contra as lagartas, alterando sua toxicidade e modos de ação. Especificamente, a metilação pode modificar a capacidade da rutina de interferir na digestão, no metabolismo ou no sistema nervoso dos insetos (Li et al., 2019; Barros et al., 2020).

Esses achados sugerem que a metilação da rutina não só potencializa os efeitos inseticidas, mas também pode enriquecer os estudos voltados ao melhoramento genético, fornecendo novas direções para a pesquisa de resistência a pragas. A exploração desses mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de cultivares de soja mais resistentes, integrando-se a programas de melhoramento e promovendo avanços significativos na proteção das culturas. A metilação de compostos bioativos, como a rutina, não apenas aumenta sua eficácia, mas também pode levar à descoberta de novos compostos com propriedades melhoradas. Além disso, a compreensão desses efeitos pode ajudar a identificar marcadores moleculares associados à resistência a insetos, facilitando a seleção assistida por marcadores. A combinação de abordagens químicas e genéticas pode, portanto, fornecer uma estratégia robusta e sustentável para o manejo integrado de pragas.

REFERÊNCIAS

- Barros, R., Meriño-Cabrera, Y., Vital, C. E., da Silva Júnior, N. R., de Oliveira, C. N., Lessa Barbosa, S., ... & de Almeida Oliveira, M. G. (2021). Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. *Pest Management Science*, 77(4), 1714-1723.
- Boddu, S. K., Ur Rehman, N., Mohanta, T. K., Majhi, A., Avula, S. K., & Al-Harrasi, A. (2022). A review on DBU-mediated organic transformations. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(3), 765-795.
- Fugi, C. G. Q., Lourenção, A. L., & Parra, J. R. P. (2005). Biology of *Anticarsia gemmatilis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agricola*, 62, 31-35.
- Gómez, J. D., Pinheiro, V. J., Silva, J. C., Romero, J. V., Merino-Cabrera, Y., Coutinho, F. S., ... & Ramos, H. J. (2020). Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the

survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 196-212.

Hoffmann-Campo, C. B., Moscardi, F., Corrêa-Ferreira, B. S., Oliveira, L. J., Sosa-Gómez, D. R., Panizzi, A. R., ... & Oliveira, E. D. (2000). *Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado* (Vol. 30). Londrina: Embrapa Soja.

Kozłowska, J., Potaniec, B., Żarowska, B., & Anioł, M. (2017). Synthesis and biological activity of novel O-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. *Molecules*, 22(9), 1485.

Moscardi, F., Bueno, A. D. F., Sosa-Gómez, D. R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C. B., Pomari, A. F., ... & Yano, S. A. C. (2012). Artrópodes que atacam as folhas da soja. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, 4, 859.

Pinheiro, V. J., Gómez, J. D., Gouveia, A. S., Coutinho, F. S., Teixeira, R. M., Loriato, V. A., ... & Ramos, H. J. (2024). Gene expression, proteomic, and metabolic profiles of Brazilian soybean genotypes reveal a possible mechanism of resistance to the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *Arthropod-Plant Interactions*, 1-18.

Silva, R. F. B., Viña, A., Moran, E. F., Dou, Y., Batistella, M., & Liu, J. (2021). Socioeconomic and environmental effects of soybean production in metacoupled systems. *Scientific Reports*, 11(1), 18662.

Straßmann, S., Brehmer, T., Passon, M., & Schieber, A. (2021). Methylation of cyanidin-3-O-glucoside with dimethyl carbonate. *Molecules*, 26(5), 1342.

Tatsuzaki, J., Ohwada, T., Otani, Y., Inagi, R., & Ishikawa, T. (2018). A simple and effective preparation of quercetin pentamethyl ether from quercetin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14(1), 3112-3121.

Tiwari, R., & Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.

War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1306-1320.

CAPÍTULO 1

GENÓTIPO DE SOJA RESISTENTE AO ATAQUE DE INSETOS-PRAGA APRESENTA ALTOS NÍVEIS DO FLAVONOL METILADO ISORAMNETINA 3-*O*-RUTINOSÍDEO

RESUMO

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é a principal commodity agrícola do Brasil. Ela serve como uma fonte essencial de proteína vegetal para ração animal e é o segundo óleo vegetal mais consumido mundialmente. A adaptabilidade da soja às diversas condições edafoclimáticas do Brasil permitiu seu cultivo em todas as regiões do país. No entanto, a sustentabilidade da produção de soja enfrenta desafios significativos devido ao ataque de espécies de insetos-praga, destacando-se a *Anticarsia gemmatilis* Hübner (1816), também conhecida como lagarta-da-soja. O manejo convencional de pragas frequentemente recorre a compostos sintéticos altamente tóxicos, representando riscos ambientais e à saúde pública. Estratégias de controle envolvem o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes, bem como de moléculas bioativas para redução das sobrevivências dos insetos, visando minimizar os impactos ambientais do uso de inseticidas convencionais. Genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos mastigadores apresentam a via metabólica de biossíntese de flavonóis derivados da quercetina ativada constitutivamente. Portanto, o objetivo deste estudo foi confirmar se o genótipo resistente IAC 17 apresenta também a ativação da via dos flavonóis metilados derivados da quercetina. De fato, análises de LCMS indicaram altas concentrações nas folhas das plantas IAC 17 do flavonol glicoconjugado quercetina 3-*O*-rutinosídeo (Rutina, $[M+H]^+$ m/z 611 Da), bem como de um flavonol metilado com estrutura análoga a rutina, putativamente identificado como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Narcissin, $[M+H]^+$ m/z 625). O íon m/z 625 foi purificado por cromatografia líquida de fase reversa (HPLC) e analisado por espectrometria de massas (LCMS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de fragmentação MS2 indicaram as perdas neutras sequenciais dos açúcares raminose (m/z 146 Da) e glicose (m/z 162 Da). Já o espectro de fragmentação MS3 da aglicona (m/z 317 Da) indicaram a presença da metilação. Tanto a metilação quanto as glicosilações também foram confirmadas pelo espectro de RMN de 1H , caracterizando o composto como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo. Além disso, foi detectada a presença de um composto com estrutura química semelhante à isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo no espectro de RMN, sugerindo a possibilidade de um isômero do composto. Portanto, esses resultados indicam que a presença de flavonoides metilados nas folhas de soja pode ser uma característica crucial para a defesa contra o ataque de insetos-praga, abrindo uma nova linha de investigação sobre os mecanismos moleculares

de resistência em cultivares de soja. Isso pode contribuir para reduzir a dependência de pesticidas sintéticos e promover práticas agrícolas mais seguras e sustentáveis ambientalmente.

Palavras-chave: soja; resistência a pragas; flavonóis metilados; isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo; *Anticarsia gemmatalis*; genótipo IAC 17.

INTRODUÇÃO

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma cultura de destaque no cenário mundial de grãos, sendo considerada atualmente a commodity mais importante para o Brasil. É a fonte de proteína vegetal mais consumida para produzir proteína animal. Além disso, seu óleo também assume um papel importante, sendo o segundo mais consumido mundialmente, atrás apenas do óleo de palma (Silva et al., 2021).

O grande potencial de mercado externo da soja e sua excelente adaptação às diferentes condições edafoclimáticas do Brasil impulsionaram seu cultivo em todas as regiões do país. O cultivo da soja firmou-se como prática tradicional nas regiões Sul, Sudeste e, posteriormente, nas regiões Centro-Oeste e Nordeste. Geralmente, a produção agrícola é realizada em grande escala, e sua comercialização segue um padrão de qualidade reconhecido mundialmente. Para atender à demanda, foi necessário o desenvolvimento de novas cultivares que permitiram elevar os patamares de produtividade em áreas tradicionais, assim como adaptar o cultivo a novas regiões (Seixas et al., 2020).

Todavia, a cultura da soja está sujeita ao ataque de diferentes espécies de insetos, como *Anticarsia gemmatalis* Hübner (1816) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta-da-soja. No Brasil, a aplicação de compostos puramente sintéticos e altamente tóxicos é a principal forma de manejo de insetos em diversas culturas agrícolas. Conforme dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde 2008 o Brasil é recordista mundial no consumo de agrotóxicos, e seu uso na agricultura já se tornou um problema de saúde pública devido à carência de ações e tecnologias que garantam o uso seguro e racional destes insumos. Como resultado, o manejo inadequado e prolongado dessas substâncias tem causado danos, muitas vezes irreparáveis, ao ecossistema, como o assoreamento e a contaminação de corpos hídricos, superficiais e subterrâneos.

Dentre as estratégias alternativas para o controle de insetos, ou pelo menos complementares ao uso de inseticidas, estão as pesquisas em melhoramento genético de plantas. No Brasil, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) foi pioneiro ao introduzir, em seu programa de melhoramento de soja, linhas de pesquisa visando à obtenção de cultivares com resistência a percevejos e outros insetos (Blain & Melo, 2022). Nesse sentido, o conhecimento de características fenotípicas específicas das plantas é importante para entender a natureza genética dessa resistência, seu modo preciso de ação, o aprimoramento dos métodos de seleção e os procedimentos a serem usados no melhoramento (War et al., 2012).

Muitos desses estudos são utilizados como ponto de partida na busca de novos compostos ativos naturais ou análogos sintéticos e semissintéticos. Por exemplo, o flavonoide rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) foi detectado em altas concentrações em genótipos de soja, tais como IAC 17 e IAC 100 (Hoffmann-Campo, 1995; Pinheiro et al., 2024) e sua atividade biológica tem sido amplamente estudada para aplicação nos programas de melhoramento de plantas como fonte de resistência a *Anticarsia gemmatilis* (Gazzoni et al., 1997; Hoffmann-Campo et al., 2006).

Além disso, outro flavonol com estrutura muito semelhante à rutina foi recentemente encontrado em altas concentrações nas folhas do genótipo IAC-17. Este composto foi identificado putativamente como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024). Seus precursores biossintéticos, isoramnetina e isoramnetina 3-*O*-glicosídeo, também foram detectados nos genótipos de soja IAC 100 e IAC 24, indicando uma possível síntese constitutiva de flavonóis metilados (Pinheiro et al., 2024). Portanto, essa via metabólica pode ser também importante para compreender o mecanismo de resistência de genótipos de soja ao ataque de insetos.

Considerando que ainda não há relatos na literatura sobre essa via biossintética para o genótipo IAC 17, o objetivo deste trabalho no primeiro capítulo foi purificar o flavonoide correspondente ao íon molecular m/z 625 Da, putativamente identificado como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo. A caracterização de sua estrutura molecular foi realizada por meio de espectrometria de massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Este estudo não apenas contribui para a compreensão dos compostos presentes no genótipo IAC 17, mas também fornece uma base para futuras pesquisas sobre o papel dos flavonoides na resistência a pragas, potencialmente auxiliando no desenvolvimento de cultivares de soja mais resistentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Crescimento de plantas

As sementes do genótipo de soja resistente a insetos IAC 17 foram obtidas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e submetidas à germinação em casa de vegetação da UFV. As plantas foram cultivadas em vasos contendo 2,0 kg de uma mistura de solo, areia e substrato na proporção de 3:1:1, sendo mantidas por 30 dias sob condições de temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Foram utilizados, ao todo, quatro vasos contendo três sementes cada um. Após as plantas atingirem o estágio de desenvolvimento V5, foi realizada a coleta das folhas (Fehr & Caviness, 1977).

As folhas coletadas foram pesadas e acondicionadas em pacotes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para preservação dos compostos químicos. A massa obtida do material fresco foi de 66,55 g. Posteriormente, as folhas foram secas separadamente em estufa a 40°C . Em seguida, o material seco foi triturado e pulverizado utilizando um liquidificador industrial, obtendo-se cerca de 18,23 g do conteúdo vegetal pulverizado.

Procedimento para extração de flavonoides

O material vegetal pulverizado foi extraído de acordo com a metodologia apresentada por Hamad (2012), utilizando um aparelho Soxhlet com 250 mL de etanol a 80% até a exaustão. O extrato foi filtrado e concentrado por evaporação sob vácuo até cerca de 10 mL, em seguida misturado com 25 mL de água destilada e extraído com éter de petróleo (3 x 50 mL) e, por último, com clorofórmio (3 x 50 mL). Após a extração, a camada aquosa foi coletada (25 mL) e mantida em local frio por 72 horas. Uma alíquota de 300 μL do extrato foi utilizada para quantificação por LCMS (UHPLC-QqQ, Agilent). O restante do volume (24,7 mL) foi seco no SpeedVac, e após a secagem, o conteúdo foi pesado na balança analítica totalizando 2,20 gramas de extrato.

Análise e separação de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a separação dos flavonoides presentes no extrato das folhas do genótipo IAC 17, realizou-se a análise preparativa por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Utilizou-se um loop de 200 μL e 20 mg do extrato. Como fase móvel, foram empregadas duas soluções: uma composta de água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e outra contendo acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (B). Duas bombas atuaram simultaneamente, possibilitando mudanças no gradiente da fase móvel durante 60 minutos, com um fluxo de 1 mL/min.

As subfrações foram monitoradas com detector UV a 375 nm, e os picos foram coletados manualmente e analisados por espectrometria de massas (MS). Após a separação, as subfrações foram armazenadas em eppendorfs e nomeadas de acordo com os respectivos tempos de retenção: 36-37, 38, 39 e 40 minutos.

Análises de flavonóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LCMS)

Para quantificação por LCMS, foram utilizados 150 mg de tecido foliar fresco pulverizado, aos quais foram adicionados 800 µL de solventes de extração (metanol: álcool isopropílico: ácido acético na proporção 20:79:1 v/v/v). Aliquotas de 5,0 µL foram injetadas no sistema LCMS disponibilizado pelo NuBioMol (Centro de Análise de Biomoléculas da UFV, Brasil). As análises foram realizadas utilizando um sistema UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo (QqQ, Agilent), operado no modo positivo, e a amostra foi escaneada pelo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), utilizando as fragmentações conforme descrito por Gomez et al. (2020): Rutina (m/z 611 > m/z 303 para quantificação; m/z 611 > m/z 145 para confirmação) e isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (m/z 625 > m/z 317 para quantificação; m/z 625 > m/z 303 para confirmação). Os espectros de massa gerados foram processados usando o software Skyline para obtenção dos cromatogramas dos íons extraídos (EIC), dos valores de área dos picos e do tempo de retenção. Curvas padrão foram usadas para converter os valores de área dos picos em µg/g de tecido vegetal.

Os perfis de fragmentação MS2 e MS3 foram obtidos por espectrometria de massas do tipo Ion Trap 2D Amazon (Bruker Daltonics). Aliquotas de 5 µL foram usadas para a análise por nano LCMS, utilizando o sistema UPLC nanoAcquity (Waters, EUA), contendo uma coluna trap e uma coluna capilar ProteCol C18 GHQ303 3,0µm - 300µm × 150mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,6 µL/min. As amostras foram automaticamente injetadas no espectrômetro de massas Ion Trap Amazon (Bruker Daltonics, Alemanha), atuando no modo online, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram: (A) água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, com o programa de gradiente consistindo em uma rampa de subida linear partindo de 2% até 50% de (B) durante 20 min, 50% até 98% de (B) durante 10 min, 98% de (B) durante 20 min, rampa de descida linear partindo de 98% até 2% durante 2 min, seguido pelo equilíbrio em 2% de (B) durante 8 min, totalizando 60 min de corrida cromatográfica. O equipamento foi operado no modo positivo e utilizando o método de escaneamento MRM e MS3 para monitoramento, isolamento e fragmentação. Os dados foram adquiridos durante 60 min, com a aquisição gerida pelo aplicativo Hystar, versão 3.2

(Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio do aplicativo DataAnalysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrão para metabolômica.

Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

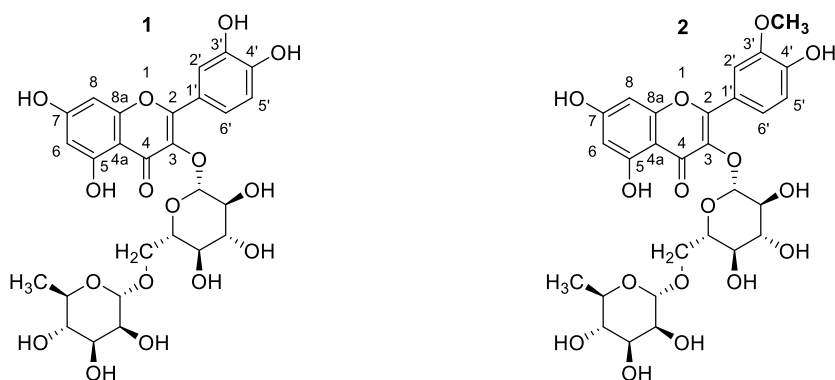
Uma alíquota de 20 mg de amostra foi solubilizada em 700 μL de metanol deuterado (CD_3OD) como solvente e analisada através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (Bruker, Ascend 400 MHz), do Laboratório Multiusuários de Caracterização de Moléculas (LMCM, UFOP, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração e purificação do flavonoide Isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo de folhas de soja

Os metabólitos de baixo peso molecular mais comumente relacionados à defesa da soja contra insetos mastigadores são os flavonoides. A rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) é reconhecida por desempenhar um papel importante na defesa da planta contra lepidópteros, sendo um dos compostos identificados em extratos de folhas dos genótipos IAC 17 e IAC 100, além de outros poucos genótipos resistentes a insetos (Gomez et al., 2018; Pinheiro et al., 2024).

Além da rutina, outro flavonol glicosilado, identificado putativamente como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, também foi encontrado em altas concentrações nas folhas do genótipo IAC 17 e IAC 100 (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024). Este flavonol possui uma estrutura química bastante similar à da rutina (**1**), diferenciando-se apenas pela presença de um grupo metoxila na posição 3' da aglicona (**2**).



A primeira etapa deste trabalho consistiu na extração e purificação do composto-alvo identificado putativamente como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Gomez et al., 2020). A análise do espectro e do cromatograma de MRM do extrato de IAC 17 permitiu a detecção do pico do íon molecular protonado $[M+H]^+$ m/z 611 da rutina, com tempo de retenção (Rt) de 8,356 minutos, e do pico do íon molecular $[M+H]^+$ m/z 625, referente à isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, com Rt de 8,864 minutos (**Figura 1**). Adicionalmente, os cromatogramas dos íons extraídos (EIC) foram utilizados para quantificar a concentração de rutina e isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo presentes nas folhas de IAC 17. As concentrações encontradas foram de 13.7 $\mu\text{g/g}$ para rutina e 10.6 $\mu\text{g/g}$ para isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo.

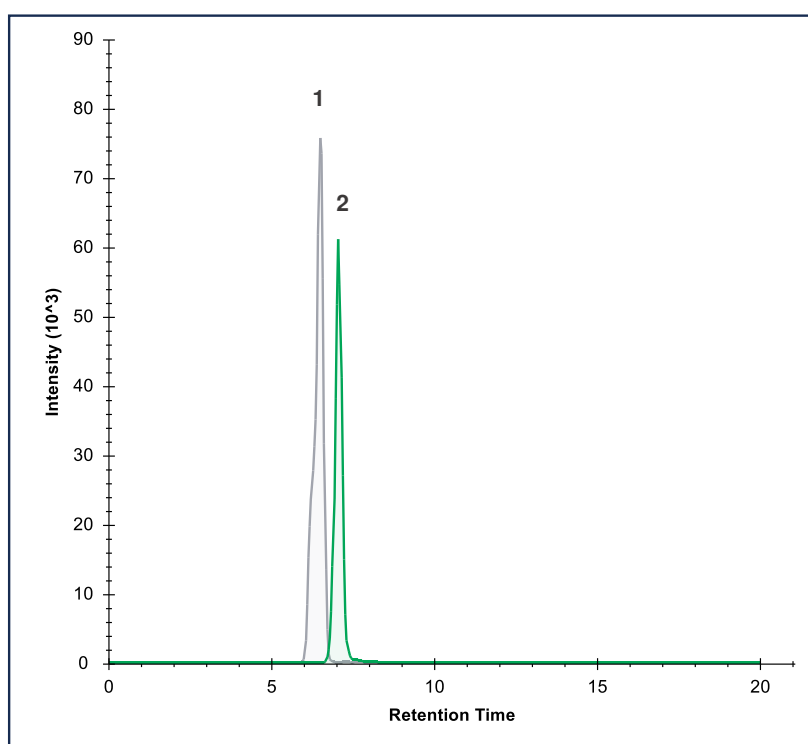


Figura 1 - Análise por LCMS do extrato metabólico total de folhas de soja do genótipo IAC 17. Os cromatogramas dos íons extraídos (EIC) foram utilizados para quantificar a concentração de rutina e isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo pelo pacote computacional Skyline. O pico 1 corresponde à rutina (Rt 8,4 min., m/z 611 > m/z 303) e o pico 2 (Rt = 8,9 min., m/z 625 > m/z 317) à isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo.

Para a separação da rutina e da isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo presentes nas folhas de soja IAC 17 (**Figura 1**), foram injetadas alíquotas de 200 μL contendo 20 μg do extrato aquoso em um HPLC preparativo para fracionamento. As subfrações eluídas foram monitoradas a 380 nm para a detecção dos flavonoides (**Figura 2**).

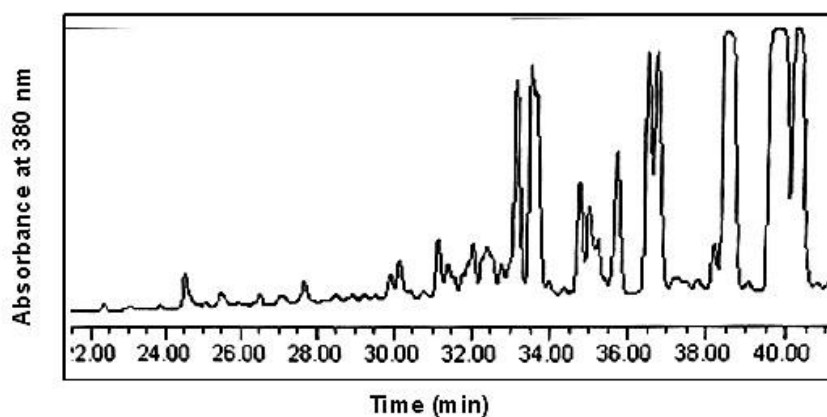


Figura 2 - Separação por cromatografia líquida preparativa do extrato aquoso enriquecido para flavonoides. As subfrações 36-37, 38.5, 39,5 e 40,5 minutos foram coletadas para análises por LCMS QqQ.

Após a análise das amostras coletadas, notou-se a purificação de isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo na subfração coletada em 40,5 minutos (sub-40) (**Figura 3**).

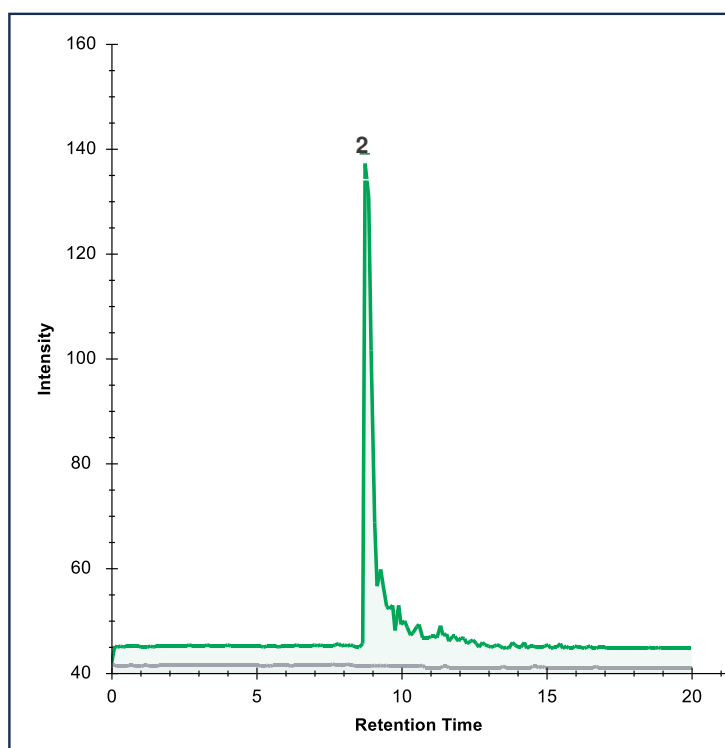


Figura 3 - Análise por LCMS QqQ da subfração com tempo de retenção de 40,5 minutos (Figura 2). O pico 2 corresponde ao monitoramento por MRM de isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (EIC para a transição m/z 625 > m/z 317). Não foram detectados sinais cromatográficos para rutina (EIC para a transição m/z 611 > m/z 303).

A presença da rutina tem sido observada em folhas de genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos-praga (Korth et al., 2000; Nick & Martins, 2009; Zhang et al., 2012). Utilizando uma abordagem de LCMS *untargeted* Gomez et al. (2018) detectou a presença de um íon m/z 625 em elevadas concentrações no genótipo IAC 17 resistente ao ataque de insetos-praga. Pesquisas contra bibliotecas de fragmentação NIST indicaram um espectro de fragmentação muito similar a isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Gomez et al., 2020), sendo a primeira vez que este flavonoide foi detectado em folhas de soja. Entretanto, a estrutura molecular não foi confirmada. Para confirmar a estrutura e a posição da metilação, frações purificadas e enriquecidas para isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (R_t = 40.5 min, **figura 3**) foram analisadas por LCMS MSn (**Figura 4**).

Foram conduzidas análises de fragmentação sequenciais para obter informações estruturais detalhadas. A fragmentação do íon precursor m/z 625 resultou no fragmento de m/z 317 [$M-146-162+H$]⁺ referente às perdas de uma molécula de glicose (GLU, 162 Da) e uma de raminose (RHAM, 146 Da). Fragmentações de flavonoides glicosilados por ESI-CAD gera fragmentações com maior frequência na ligação O-glicosídica do açúcar ao anel das agliconas. Portanto, em fragmentação gera um fragmento de elevada intensidade contendo a aglicona (**Figura 4A**). Desta forma, pouca informação estrutural dos anéis pode ser obtida da fragmentação MS2. A estrutura da aglicona metilada (isoramnetina) foi confirmada pelo isolamento e fragmentação do íon m/z 317 (**Figura 4B**). Os fragmentos indicados foram preditos utilizando a plataforma CFM-ID (<https://cfmid.wishartlab.com/>), indicando um fragmento de alta intensidade correspondendo a uma perda do grupo metil (m/z 302 [$M-15+H$]⁺). A estrutura dos fragmentos m/z 285, 261 e 229 foram também confirmados (**Figura 4B**). Estes resultados estão em concordância com a abordagem de LC-MS *untargeted* utilizada por Gomez et al. (2018), onde pesquisas em bibliotecas de fragmentação NIST indicaram um espectro de fragmentação muito similar ao isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, marcando a primeira detecção deste flavonoide em folhas de soja.

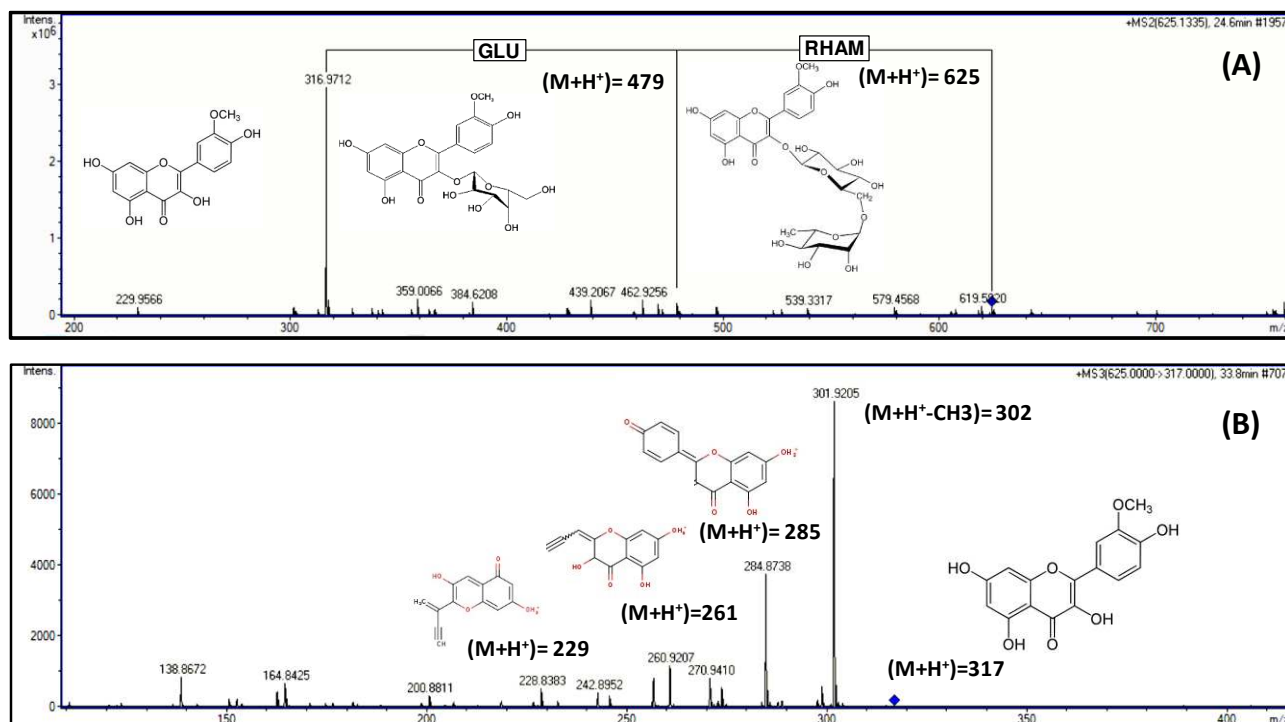


Figura 4 - Análise do padrão de fragmentação do íon m/z 625 por LCMS MSn usando Ion Trap. Em (A) o espectro de fragmentação MS2 do íon molecular m/z 625. As perdas neutras para a glicose (glu, 162 Da) e raminose (rham, 146 Da) estão indicadas. Em (B) o espectro de fragmentação MS3 para o fragmento m/z 317 gerado em (A) pela fragmentação do íon m/z 625. Os losangos em azul indicam o íon molecular que foi isolado para fragmentação. Os fragmentos indicados foram preditos utilizando a plataforma CFM-ID (<https://cfmid.wishartlab.com/>).

Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Como visto anteriormente, após a separação por LCMS foi detectada a presença majoritária de isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo na subfração coletada em 40 minutos (sub-40). Logo, a amostra sub-40 foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (400 MHz), utilizando metanol deuterado (CD_3OD) como solvente.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 5**) foram destacados dois diferentes sinais em δ 3,95 (a) e δ 3,97 (b) atribuídos aos átomos de hidrogênio da metoxila ($-\text{OCH}_3$), localizada na posição 3' do composto. Foi observado também o sinal em δ 4,53 que corresponde ao hidrogênio H-1''' na ramnose e o sinal em δ 5,24 para o hidrogênio H-1'' presente na glicose. Ademais, os sinais observados em δ 6,22 e δ 6,42 são referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 da aglicona. Por último, os deslocamentos químicos encontrados para H-5', H-6' e H-2' foram δ 6,91, δ 7,63 e δ 7,95, respectivamente. Estes dados coincidem com os sinais dos deslocamentos químicos registrados na literatura (Sang et al.,

2002; Atay et al., 2015; Ganbaatar et al., 2015) para isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo no espectro de RMN de ^1H .

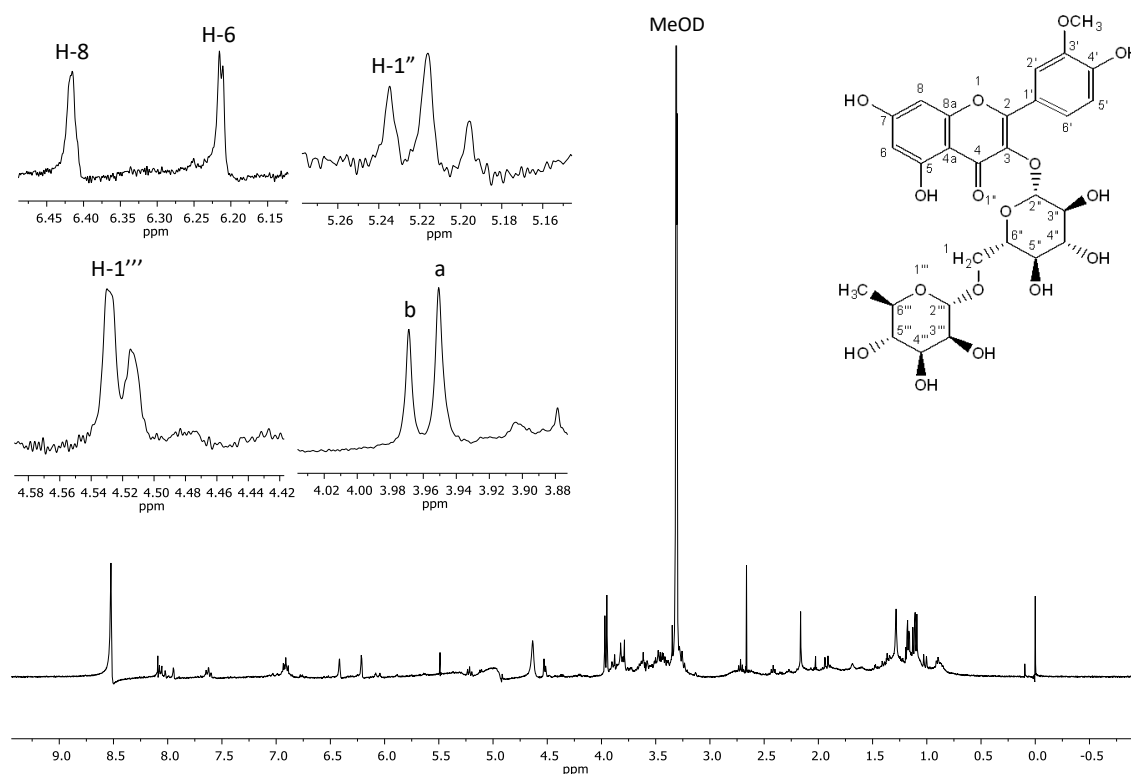


Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da subfração de Rt 40,5 min.

Como dito anteriormente, foram observados dois sinais com deslocamentos químicos diferentes em δ 3,95 e δ 3,97 que correspondem aos átomos de hidrogênio em CH-O da metoxila na posição 3' do composto. Esses sinais correspondem à isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo e um isômero detectado, porém não é possível determinar, com base no espectro, qual sinal pertence a cada composto. Para mais informações do isômero, foi detectado outro sinal de deslocamento químico em δ 5,49 para o hidrogênio de H-1'' na glicose e o sinal em δ 8,02 do hidrogênio de H-2' na aglicona (**Tabela 1**). Ademais, foram observados sinais com deslocamentos químicos em δ 6,04 e δ 6,08, porém em virtude da presença de algumas impurezas na amostra, os dados obtidos por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram considerados inconclusivos para a caracterização do isômero.

Em resumo, a análise do espectro de RMN de ^1H também revelou a presença de um composto com estrutura altamente similar à isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo. Notavelmente, os sinais correspondem principalmente aos hidrogênios na unidade glicosídica em H-1''' e na aglicona em H-2', o que corrobora sua similaridade estrutural (**Tabela 1**). De acordo com a literatura, observou-se que o composto isoramnetina 3-*O*-robinobiosídeo se trata de um flavonoide que é isômero da

isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo. Após análise dos valores de ^1H para este composto, concluiu-se que além da unidade glicosídica da ramnose, também existe uma outra unidade glicosídica que neste composto correspondente à galactose. Houve também a constatação de um grupo metoxila ($-\text{O}-\text{CH}_3$) na posição 3' devido a um sinal em δ 3,91, semelhante ao da isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Gallegos et al., 2008).

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de ^1H (400 MHz, CD_3OD) atribuídos ao flavonoide isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo e ao isômero detectado.

	Isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo Experimental (MeOD)	Isoramnetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo Sang et al. 2002 (MeOD)	Isômero Experimental (MeOD)	Isoramnetina 3- <i>O</i> -rubinobiosídeo Gallegos et al. 2008 (DMSO)
Posição	δH , ppm	δH , ppm	δH , ppm	δH , ppm
6	6,22	6,20	6,04	6,25
8	6,42	6,41	6,08	6,48
5'	6,91	6,92		6,96
6'	7,63	7,61		7,57
2'	7,95	7,95	8,02	8,04
1''	5,24	5,25	5,49	5,49
1'''	4,53	4,54		4,48
3'- OCH_3	3,20-3,90	3,20-3,90	3,95	3,91

Portanto, existe a possibilidade da presença também do flavonol isoramnetina 3-*O*-robinobiosídeo na subfração Rt 40,5 min (sub-40). Vale ressaltar que Gomez et al. (2018) também observou flavonóis com diferentes glicosilações, incluindo adições de glicose ou galactose, indicando uma baixa especificidade dessas glicosidases nas folhas de soja.

Pinheiro et al. (2024) identificaram a presença do íon m/z 625 putativamente identificado como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo em outros dois genótipos de soja IAC 100 e IAC 17 resistentes ao ataque de insetos-praga. Portanto, esses flavonóis glicoconjugados metilados derivados da quercetina podem ser importantes para o mecanismo de resistência da soja ao ataque de insetos-praga. De fato, os perfis de flavonóis nestes genótipos indicaram elevada atividade de glicosidases e metilases com o desvio metabólico tanto para rutina quanto para isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Pinheiro et al., 2024).

Os flavonoides têm sido particularmente atrativos, extensamente estudados e tornaram-se agentes mais promissores no tratamento do câncer, estresse oxidativo, bactérias patogênicas, inflamações, disfunções cardiovasculares, etc. Entretanto, estudo *in vivo* não tem confirmado suas

potencialidades para aplicações na área da saúde humana, principalmente em função da instabilidade e a muito baixa biodisponibilidade. Alguns estudos têm demonstrado que a metilação desses flavonoides pode aumentar eficácia (Koirala et al., 2016; Wen et al., 2017). A metilação dos flavonoides via seus grupos hidroxila livres ou átomo de carbono aumenta dramaticamente sua estabilidade metabólica e melhora o transporte pela membrana, levando a uma absorção facilitada (Koirala et al., 2016). Portanto, essa característica genética pode ter sido herdada durante o processo de seleção de genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos-praga (Fugi et al., 2005).

Os flavonoides metilados são comuns em plantas, embora sejam menos abundantes do que os flavonoides ou glicosídeos de flavonoides. A metilação C e a metilação O são dois padrões comuns de metilação de flavonoides. Os flavonoides metilados na posição C ocorrem em um número limitado de plantas. Em contraste, flavonoides metilados na posição O estão amplamente presentes em fontes vegetais naturais, embora seus níveis sejam frequentemente mais baixos do que os de seus precursores flavonoides (Wen et al., 2017). Entretanto, observou-se que a isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo está presente em altos níveis nas folhas do genótipo IAC 17, sendo quantidades equivalentes da rutina, que é a forma não metilada da isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo. Portanto, esse genótipo apresenta nas folhas uma indução constitutiva da via de metilação da quercetina, bem como da glicosilação da quercetina e da isoramnetina (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024).

A metilação tem sido documentada como um meio de melhorar a entrada de flavonoides nas células e de evitar a degradação (Wen & Walle, 2006). Tem sido observado que os flavonoides metilados parecem ser agentes quimiopreventivos mais potentes do que os flavonoides não metilados (Walle et al., 2007). Portanto, a forma metilada da rutina (isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo) pode ser mais efetiva na redução da sobrevivência das lagartas alimentando das folhas da soja IAC 17, em comparação a rutina. Essa suposição pode ser verdadeira visto que os flavonóides sofrem metabolismo de fase I e II no fígado e intestino delgado, o que leva a formação de sulfatos de flavonóides, glicuronóides e metilatos (Wen et al., 2017). Em contraste, os flavonóides metilados têm uma via metabólica diferente, podendo ser mais estáveis e efetivos em provocar alterações na fisiologia e morfologia dos intestinos das lagartas da soja como observado por Gomez et al. (2020) em ensaios de suplementação da dieta com extratos foliares.

CONCLUSÕES

As estratégias de purificação e análises espectroscópicas por espectrometria de massas (MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) confirmaram a presença em elevadas concentrações do flavonoide isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo no extrato aquoso das folhas do genótipo de soja IAC 17, resistente ao ataque de insetos-praga. Além da identificação da isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, foi

possível observar a presença de um composto com estrutura química bastante similar à isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo no espectro obtido por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), com diferenças na glicosilação, sugerindo um possível isômero do composto. Portanto, a metilação de flavonoides pode ser importante para o mecanismo de resistência ao ataque de insetos-praga mastigadores. A atividade biológica destas formas metiladas de flavonóis derivados da quercetina precisam ser confirmadas em ensaios *in vivo* de redução da sobrevivência de lagartas alimentadas com dietas suplementadas com as formas metiladas e não metiladas. Esses resultados destacam a importância da análise detalhada de compostos presentes em plantas resistentes a pragas, fornecendo insights valiosos para futuras pesquisas sobre a bioatividade e potencial uso agrícola desses compostos.

REFERÊNCIAS

- Atay, I., Kırmızıbekmez, H., & Ahmet, C.G. "Secondary metabolites from *Sambucus ebulus*." *Turkish Journal of Chemistry*, 39(1), 34-41, 2015.
- Blain, G.C., & Melo, L.H.S. "Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agrônômico." *O Agrônômico*, 74, 2022.
- Fehr, W.R., & Caviness, C.E. "Stages of soybean development." Ames: Iowa State University of Science and Technology. Special report, 1-11, 1977.
- Fugi, C.G.Q., Lourenção, A.L., & Parra, J.R.P. "Biology of *Anticarsia gemmatilis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects." *Scientia Agricola*, 62, 31–35, 2005.
- Gallegos-Olea, R.S., Borges, M., Borges, A., Freire, S., Silveira, L., Vilegas, W., ... & Costa, J.L. "Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae)." *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 29-33, 2008.
- Ganbaatar, C., Gruner, M., Mishig, D., Duger, R., Schmidt, A.W., & Knölker, H.-J. "Flavonoid glycosides from the aerial parts of *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce growing in Mongolia." *Open Natural Products Journal*, 8(1), 1–7, 2015.
- Gazzoni, D.L., Hülsmeier, A., & Hoffmann-Campo, C.B. "Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatilis*." *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32(7), 673-681, 1997.

Gómez, J.D., Pinheiro, V.J., Silva, J.C., Romero, J.V., Merino-Cabrera, Y., Coutinho, F.S., ... & Ramos, H.J. "Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars." *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 196-212, 2020.

Gómez, J.D., Vital, C.E., Oliveira, M.G., & Ramos, H.J. "Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae)." *PloS One*, 13(10), 2018.

Hamad, M.N. "Isolation of rutin from *Ruta graveolens* (Rutaceae) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization." *Pharmacie Globale*, 3(4), 1, 2012.

Hoffmann-Campo, C.B., Ramos Neto, J.A., Oliveira, M.C.N.D., & Oliveira, L.J. "Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatilis*." *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1453-1459, 2006.

Koirala, N., Thuan, N.H., Ghimire, G.P., Thang, D.V., & Sohng, J.K. "Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production." *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 103-16, May 2016.

Michelin, V., & Boiça Júnior, A. L. "Determinação dos tipos de resistência de genótipos de soja ao ataque de *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepdoptera: Noctuidae)." Universidade Estadual Paulista (UNESP). Disponível em: UNESP Repositório.

Moura, A., Vilega, W., & Santos, L.S. "Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar." *Química Nova*, 34, 1136-1140, 2011.

Nick, A. M., & Martins, P. K. "Flavonoids in soybean: biological function and beneficial effects on human health." *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 21(4), 219-229, 2009.

Pinheiro, V.J., Gómez, J.D., Gouveia, A.S., Coutinho, F.S., Teixeira, R.M., Loriato, V.A., ... & Ramos, H.J. "Gene expression, proteomic, and metabolic profiles of Brazilian soybean genotypes reveal a possible mechanism of resistance to the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*." *Arthropod-Plant Interactions*, 1-18, 2024.

Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.-S., Lachance, P.A., Ho, C.-T., & Rosen, R.T. "Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batch)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2459–2463, 2002.

- Seixas, C.D.S., Neumaier, N., Balbinot Junior, A.A., Krzyzanowski, F.C., & Leite, R.M.V.B. "Tecnologias de Produção de Soja." Embrapa Soja, 17, 1-347, 2020.
- Silva, R.F.B., Viña, A., Moran, E.F., Dou, Y., Batistella, M., & Liu, J. "Socioeconomic and environmental effects of soybean production in metacoupled systems." Scientific Reports, 11(1), 18662, 2021.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. "Mechanisms of plant defense against insect herbivores." Plant Signal Behav, 7, 1306-20, 2012.
- Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., & Yang, B. "Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids." Annals of the New York Academy of Sciences, Issue: Phytochemicals in Medicine and Food REVIEW, 2016.
- Wen, X., & Walle, T. "Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability." Drug Metabolism and Disposition, 34, 1786–1792, 2006.

CAPÍTULO 2

METILAÇÕES NO FLAVONOIDE RUTINA OBTIDAS POR SÍNTESE ORGÂNICA REDUZEM A SOBREVIVÊNCIA DA LAGARTA-DASOJA *Anticarsia gemmatilis*

RESUMO

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é um dos principais pilares da agricultura brasileira e mundial, sendo crucial tanto como fonte de proteína vegetal para ração animal quanto como o segundo óleo vegetal mais consumido globalmente. Sua adaptação excepcional às diversas condições edafoclimáticas do Brasil possibilitou seu cultivo em todas as regiões do país. No entanto, a sustentabilidade dessa produção enfrenta desafios significativos devido ao impacto de pragas, como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner), que frequentemente exigem o uso de compostos sintéticos altamente tóxicos, apresentando riscos ambientais e à saúde pública. Estratégias de controle de pragas têm se voltado cada vez mais para o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes e para a identificação de moléculas bioativas que possam reduzir a sobrevivência de insetos, visando mitigar os impactos do uso de inseticidas convencionais. Genótipos de soja resistentes a insetos mastigadores frequentemente apresentam a via metabólica de biossíntese de flavonóis derivados da quercetina ativada constitutivamente, destacando-se o genótipo resistente IAC 17. Este estudo teve como objetivo avaliar metodologias para a obtenção de flavonóis glicoconjugados com múltiplas metilações e investigar seus efeitos na sobrevivência de *Anticarsia gemmatilis*. A metilação da rutina foi eficientemente realizada utilizando metodologias com iodeto de metila e dimetil carbonato (DMC) como agentes metilantes, e adição de DBU (1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno) especificamente na reação envolvendo DMC. Foram avaliados diferentes protocolos para obtenção das formas mono-, di-, tri- e tetra-metiladas da rutina. Ensaios de sobrevivência com lagartas alimentadas com dietas enriquecidas com formas metiladas e não metiladas da rutina revelaram que a metilação intensifica a redução da sobrevivência. Lagartas expostas a metilações na rutina apresentaram uma mortalidade de 90% após cinco dias, antecipando em até dez dias o efeito observado com a rutina não metilada. Esses resultados destacam o potencial das metilações de flavonóis derivados da rutina como uma estratégia promissora e eficaz para o controle de insetos-praga mastigadores. Além de contribuir para a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas, essas descobertas têm o potencial de orientar o desenvolvimento de novas abordagens no manejo integrado de pragas agrícolas, promovendo práticas sustentáveis e reduzindo significativamente a dependência de pesticidas sintéticos.

Palavras-chave: Metilação de flavonoides; rutina; iodeto de metila; dimetil carbonato; sobrevivência de lagartas; *Anticarsia gemmatilis*; controle de pragas.

INTRODUÇÃO

Polifenóis como flavonoides são amplamente encontrados no reino vegetal e desempenham um papel crucial em diversos mecanismos de defesa contra estresses ambientais, incluindo autodefesa contra insetos e tolerância à seca. O flavonol rutina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo) tem sido detectado em genótipos de soja resistente ao ataque de insetos-praga (Hoffmann-Campo et al., 2001; Piubelli et al., 2005; Gomez et al., 2018; Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024). Esse composto é amplamente utilizado como marcador molecular em programas de melhoramento genético, servindo como uma fonte de resistência contra insetos desfolhadores. A rutina demonstrou efeitos antinutricionais em diversos insetos mastigadores, incluindo a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Hoffmann-Campo et al., 2006). Esta lagarta é uma praga desfolhadora significativa da soja no Brasil e tem sido usada como modelo para estudos dos mecanismos moleculares de resistência da soja ao ataque de insetos mastigadores (Silva-Junior et al., 2022; Pinheiro et al., 2024).

Duas estratégias principais têm sido utilizadas para o controle de insetos-praga: o desenvolvimento de genótipos resistentes e a aplicação em larga escala de inseticidas. No caso da soja, foram obtidas linhagens com diferentes níveis de resistência, incluindo resistência múltipla em genótipos como IAC 100, IAC 17 e IAC 24 (Fugi et al., 2005). No entanto, a estratégia mais comum ainda é a aplicação de grandes quantidades de inseticidas, o que é prejudicial tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana. Portanto, a implementação de resistência nas variedades amplamente cultivadas no Brasil poderia reduzir os impactos negativos do uso de inseticidas. Essa implementação, entretanto, tem sido dificultada pela falta de compreensão dos determinantes genéticos da resistência ao ataque de insetos mastigadores (War et al., 2012).

Outra estratégia de controle de insetos-praga poderia ser o desenvolvimento e o uso de inseticidas a partir de compostos naturais produzidos pelas plantas (Ahmed et al., 2021; Pereira et al., 2024). Produtos naturais de plantas com bioatividade contra insetos incluem várias classes de moléculas, como terpenos, flavonoides, alcaloides, polifenóis, entre outros (Souto et al., 2021). Os flavonoides têm o potencial de serem eficazes em medidas de controle de pragas, desempenhando um papel importante na proteção natural das plantas contra insetos e herbívoros que se alimentam delas. As plantas produzem flavonoides e isoflavonoides que influenciam o comportamento,

crescimento e desenvolvimento dos insetos, protegendo-as de pragas. Portanto, esses compostos são bons candidatos para o desenvolvimento de novos pesticidas com sustentabilidade ambiental.

Gomez et al. (2018) utilizaram uma estratégia baseada em LCMS-alvo para mapear uma ampla faixa de perfis de flavonoides presentes em extratos do genótipo de soja IAC 17, resistente ao ataque de insetos-praga. Nesse estudo, foi observado um desvio metabólico para a biossíntese constitutiva de flavonóis no genótipo resistente, incluindo outras quercetinas glicosiladas além da rutina. Subsequentemente, Pinheiro et al. (2024) confirmou esse mesmo desvio metabólico em outros genótipos de soja resistentes, como IAC 100 e IAC 24, indicando que essa é uma característica herdada durante a seleção para resistência ao ataque de insetos-praga.

Gomez et al. (2020), aplicando uma estratégia de LCMS-não alvo, detectaram a presença de um flavonol metilado, putativamente identificado como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, presente em elevadas concentrações nos genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos-pragas (Pinheiro et al., 2024). Análises espectroscópicas por LCMS e RMN confirmaram sua estrutura como isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo. Este flavonol possui uma estrutura química bastante similar à da rutina, diferenciando-se apenas pela presença de um grupo metoxila na posição 3' da aglicona (Assis et al., 2024, capítulo 1). Análises de expressão gênica e metabolômica confirmaram o desvio metabólico para a biossíntese de compostos metilados derivados da quercetina, como isoramnetina, isoramnetina 3-*O*-glicosídeo e isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo (Pinheiro et al., 2024).

De fato, genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos-praga apresentam elevadas concentrações de rutina e sua forma metilada equivalente, isoramnetina 3-*O*-rutinosídeo, indicando que a via dos flavonóis metilados pode ser crucial para o mecanismo de resistência da soja ao ataque de insetos-praga (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024). De acordo com a literatura, os flavonoides metilados são importantes derivados naturais com múltiplos benefícios à saúde em comparação com as formas não metiladas, apresentando melhor biodisponibilidade e estabilidade (Wen et al., 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias de obtenção da rutina metilada para verificar a importância de metilações em flavonóis glicosilados derivados da quercetina para o mecanismo de resistência da soja a insetos-praga mastigadores, tais como *Anticarsia gemmatilis*. Obtenção de múltiplas metilações da rutina foram mais eficientes utilizando-se o iodeto de metila nas reações de derivatização, em comparação com a utilização do catalizador DBU (1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno). Ensaios *in vitro* de sobrevivência da lagarta-da-soja alimentadas com dietas suplementadas com os produtos de metilação indicaram que a metilação de

flavonóis derivados da rutina aumenta a mortalidade do inseto-praga. Esses resultados poderão ser importantes para desenvolvimento de estratégias de controle de insetos-praga.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reação de metilação da rutina com DMC/DBU

A um tubo de vidro Pyrex®, contendo uma barra de agitação magnética, foram transferidos 12 mg (20 μ mol) de rutina, 440 μ L (2,95 mmol) do catalisador 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) e 2 mL de carbonato de dimetila (DMC). O tubo foi devidamente fechado e a mistura reacional foi mantida a uma temperatura de 95°C por 90 minutos, com agitação constante para garantir a homogeneidade da reação. Após o período de 90 minutos, foram adicionados 2 mL de metanol à mistura reacional para facilitar a remoção dos azeótropos de DMC sob fluxo de nitrogênio (Straßmann et al., 2021). Este processo foi também realizado com o auxílio de rota-evaporação à vácuo, visando a eliminação completa do DMC e outras impurezas voláteis. Posteriormente, a quantidade de rutina utilizada na reação foi ajustada para 100 mg. Após remoção do DMC, foram avaliadas estratégias metodológicas para remoção do DBU.

Tentativa de remoção do DBU por extração líquido-líquido

Em um béquer, foram adicionados 15 mL da mistura reacional e o pH ajustado para 5 mediante adições lentas de 200 μ L de HCl 1M. A outra metade da solução (15 mL) foi mantida sem ajuste de pH. A partir da solução acidificada, foi realizada uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3 x 30 mL). Para a solução não acidificada, foi efetuada a partição com éter dietílico (3 x 30 mL) (Kozłowska et al., 2017). Em ambas as partições, tanto a fase orgânica quanto a fase aquosa foram coletadas. Subsequentemente, essas fases foram concentradas sob pressão reduzida para remover os solventes voláteis. Os resíduos resultantes foram então analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (LCMS) para confirmar a remoção do DBU e verificar a pureza dos produtos sintetizados.

Remoção do DBU por HPLC preparativo

Após a análise dos espectros de massas, foi possível observar a remoção parcial do catalisador na fase orgânica da partição com acetato de etila. Para garantir a remoção completa do catalisador, foi empregada uma metodologia de separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Utilizando um loop de 200 μ L e 90 mg da amostra, a separação foi realizada com uma fase móvel composta por uma mistura de metanol e água (50:50 v/v). Ao todo, foram obtidas cinco subfrações,

numeradas de 1 a 5, coletadas sequencialmente durante o processo de eluição. Para a análise detalhada dessas subfrações, foram retirados 300 µL de cada uma para serem analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (LCMS).

Reação de metilação da rutina com iodeto de metila e carbonato de potássio

A tubo de vidro Pyrex®, foram adicionados 20 mg de rutina (MM = 610,52 g/mol, 94%, 0,031 mmol) e 3 mL de solvente anidro (acetona, acetonitrila/metanol 2:1 ou acetona/metanol 2:1). A essa suspensão, adicionaram-se 0,0342 g (0,248 mmol, 8 equivalentes) de carbonato de potássio anidro e 19,2 µL (0,31 mmol, 10 equivalentes) de iodeto de metila (MM = 141,94 g/mol, d = 2,28 g/mL, 99%). A mistura resultante foi mantida à 56 °C por 60 horas (Kozłowska et al., 2017). Após esse período, adicionaram-se 2 mL de etanol, e a mistura foi filtrada para remover o carbonato de potássio, lavando o conteúdo retido no filtro com etanol. O solvente foi então removido por rota-evaporação, resultando em 23,4 mg, 66,3 mg e 73,7 mg, usando, respectivamente, acetona, acetonitrila/metanol e acetona/metanol como solventes. O material resultante foi submetido a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (LCMS).

Análises de flavonóis por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LCMS)

Os perfis de fragmentação MS2 e MS3 foram obtidos por espectrometria de massas do tipo Ion Trap 2D Amazon (Bruker Daltonics). Alíquotas de 5 µL foram usadas para a análise por nano LCMS, utilizando o sistema UPLC nanoAcquity (Waters, EUA), contendo uma coluna trap e uma coluna capilar ProteCol C18 GHQ303 3,0µm - 300µm × 150mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,6 µL/min. As amostras foram automaticamente injetadas no espectrômetro de massas Ion Trap Amazon (Bruker Daltonics, Alemanha), atuando no modo online, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram: (A) água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, com o programa de gradiente consistindo em uma rampa de subida linear partindo de 2% até 50% de (B) durante 20 min, 50% até 98% de (B) durante 10 min, 98% de (B) durante 20 min, rampa de descida linear partindo de 98% até 2% durante 2 min, seguido pelo equilíbrio em 2% de (B) durante 8 min, totalizando 60 min de corrida cromatográfica. O equipamento foi operado no modo positivo e utilizando o método de escaneamento MRM e MS3 para monitoramento, isolamento e fragmentação. Os dados foram adquiridos durante 60 min, com a aquisição gerida pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio do aplicativo

DataAnalysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrão para metabolômica.

Alíquotas de 5,0 µL foram também injetadas no sistema LCMS disponibilizado pelo NuBioMol (Centro de Análise de Biomoléculas da UFV, Brasil). As análises foram realizadas utilizando um sistema UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas de triplo quadrupolo (QqQ, Agilent), operado no modo positivo, e a amostra foi escaneada pelo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Os espectros de massa gerados foram processados usando o software Skyline para obtenção dos cromatogramas dos íons extraídos (EIC), dos valores de área dos picos e do tempo de retenção. Curvas padrão foram usadas para converter os valores de área dos picos em µg/g de tecido vegetal.

Preparo do ensaio biológico com *Anticarsia gemmatalis*

Os ovos de *Anticarsia gemmatalis* foram adquiridos do Centro Nacional de Pesquisas da Soja (CNP-Soja, EMBRAPA, Londrina, PR, Brasil) e mantidos no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, sob condições controladas de temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 14 horas de luz para 10 horas de escuridão (14:10 L).

As formas adultas de *Anticarsia gemmatalis* foram alojadas em gaiolas de 50 x 50 cm, forradas com folhas de papel sulfite A4 para facilitar a oviposição. Estas gaiolas foram providas com uma solução nutritiva, incorporada em algodão e disposta no fundo da gaiola sobre uma placa de Petri. A postura de ovos por parte de *A. gemmatalis* ocorreu após o terceiro dia, sendo depositada na superfície do papel interno da gaiola. As folhas de papel com ovos foram removidas, cortadas em tiras de 2,5 cm de largura por 10 cm de comprimento, e então colocadas em potes plásticos de 500 mL contendo um orifício circular na tampa, aproximadamente de 2 cm de diâmetro, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses potes foram posteriormente transferidos para uma câmara climatizada mantida a 25°C , com umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas de luz, regulado por temporizadores acoplados a lâmpadas do tipo luz-do-dia. Essas condições de criação e manutenção foram escolhidas para garantir o desenvolvimento adequado dos insetos e proporcionar um ambiente propício para a oviposição e desenvolvimento dos ovos até a eclosão das larvas.

Os ensaios biológicos foram realizados após a observação de lagartas no segundo instar, momento em que se iniciou a individualização e a introdução alimentar baseada na metodologia descrita por Hoffmann-Campo et al. (1985). Os compostos purificados e sintetizados foram adicionados à dieta artificial do inseto (60g), com a concentração baseada na porcentagem de 0,641%

de rutina (400 mg) encontrada por Hoffmann-Campo (1995) em genótipos de soja. Cada tratamento foi replicado 2 vezes de forma independente, utilizando 32 lagartas por tratamento. A alimentação referente a cada composto foi monitorada diariamente durante 20 dias para registrar possíveis efeitos na sobrevivência das lagartas.

A avaliação da sobrevivência foi estimada utilizando o método Kaplan-Meier e os valores foram comparados com os obtidos a partir da avaliação das testemunhas alimentadas com os controles positivos e negativos. Os tratamentos consistiram em: controle negativo 1, contendo água (dieta + H₂O), controle negativo 2, contendo meio reacional sem rutina (dieta + reagentes da síntese), controle positivo 1, contendo rutina 0,64% (dieta + rutina) e tratamento produtos da síntese 0,64% (dieta mais produtos de metilação da rutina). Essa abordagem experimental foi escolhida para avaliar o potencial dos compostos metilados ou não sobre a sobrevivência das lagartas de *Anticarsia gemmatilis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reações de metilação de compostos fenólicos

Dada a importância dos flavonoides, que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas, compostos como a quercetina têm sido objetos de sínteses bem-sucedidas utilizando uma grande variedade de estratégias (Bouktaib et al. 2002; Cren-Olivé et al. 2002). Esses compostos desempenham um papel crucial na promoção da saúde humana, contribuindo para a prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. No que se refere às reações de metilação desses compostos, a utilização de carbonato de dimetila (DMC) como reagente vem apresentando destaque por ser ecologicamente sustentável e segura (Straßmann et al., 2021).

Para a síntese com DMC, duas abordagens são fundamentais: a carboximetilação em baixas temperaturas e a metilação em temperaturas superiores a 120°C (Tundo et al., 2018). O ponto crítico da carboximetilação e metilação reside no mecanismo de hidrólise do grupo éster do DMC e no tipo de álcool presente na estrutura a ser metilada. A literatura indica que a metilação é preferencial em álcoois arílicos, enquanto a carboximetilação é mais eficiente em álcoois alifáticos. Para flavonoides como rutina e quercetina, as reações ocorrem tipicamente entre 120°C e 200°C (Ouk et al., 2002; Ouk et al., 2003). No entanto, temperaturas acima de 100°C podem comprometer a estabilidade e a estrutura desses compostos, como observado por Chaaban (2017), onde a rutina e a quercetina degradaram completamente após 45 minutos a 130°C. Portanto, uma metilação eficaz exige um catalisador adequado para evitar a carboximetilação, acelerar a reação e manter a temperatura abaixo de 100°C (Shieh et al., 2001).

No estudo conduzido por Straßmann et al. (2021), foram utilizados diversos reagentes para a reação de metilação, incluindo quercetina e seus derivados como substratos, dimetil carbonato (DMC) como agente metilante, e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) como catalisador. O DBU, conhecido por sua forte basicidade e eficiência em reações de metilação e alquilação (Shieh et al., 2001), facilitou a desprotonação dos grupos hidroxila, promovendo a metilação de forma eficiente. A reação, realizada em condições controladas de temperatura (80-100°C) por um período de 4-12 horas, resultou na obtenção de diversos produtos metilados, incluindo 3-*O*-metilquercetina, 5-*O*-metilquercetina e 7-*O*-metilquercetina. Os produtos foram analisados e purificados, demonstrando rendimentos de 70% a 95% e alta seletividade.

Considerando as propriedades do DMC e os bons resultados obtidos nas reações de metilação de quercetina e derivados, a estratégia reportada por Straßmann et al. (2021) foi escolhida para a *O*-metilação da rutina. Estudos recentes confirmam que a combinação de DBU e DMC é eficaz na metilação seletiva de fenóis e flavonoides, garantindo bons rendimentos e alta seletividade (Zhang et al., 2020; Li et al., 2019). O mecanismo proposto por Bernini et al. (2011) para a reação de metilação da rutina envolve o DBU desprotonando os grupos hidroxila (-OH) da rutina para formar íons fenóxido (ArO^-). Simultaneamente, o DBU também reage com o DMC, gerando um intermediário reativo. Os íons fenóxido resultantes da rutina atacam então o carbono eletrofílico do DMC, levando à transferência do grupo metila e à formação de grupos metóxi ($-\text{OCH}_3$), enquanto o metanol é liberado como subproduto. Após facilitar a transferência do grupo metila para a rutina, o DBU é regenerado à sua forma original:

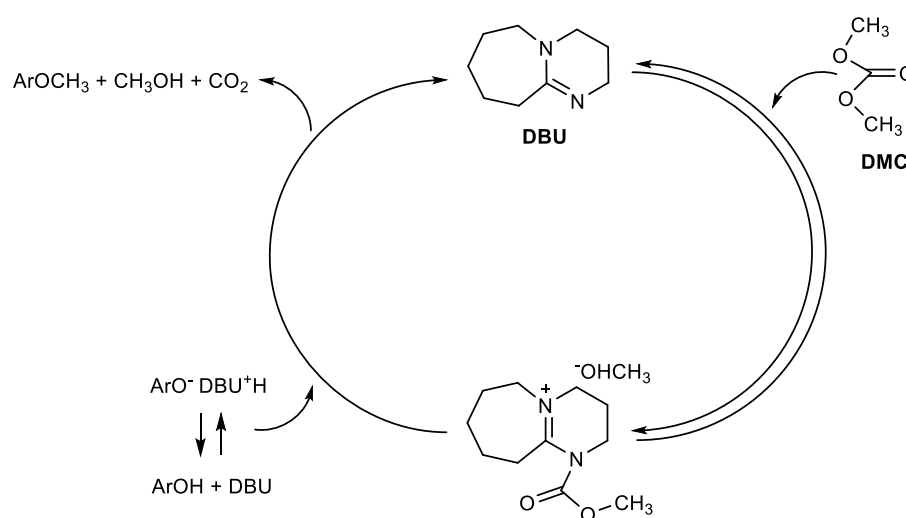


Figura 1 - Ciclo catalítico da reação de metilação de compostos fenólicos com DMC/DBU, proposto por Bernini et al. (2011).

Embora amplamente utilizado como catalisador em sínteses orgânicas, o 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-eno (DBU) é considerado tóxico para os seres humanos se ingerido. Este composto pode causar queimaduras na pele e lesões oculares graves, além de ser comprovadamente nocivo para organismos aquáticos e para o meio ambiente (DBU Material Safety Data Sheet, 2003). Diante desses riscos e visando prevenir efeitos indesejáveis futuros nos ensaios biológicos com *Anticarsia gemmatilis*, optou-se por remover o DBU do conteúdo sintetizado.

Apesar de não encontrarmos metodologias na literatura para purificar a rutina após a metilação usando DBU como catalisador, tentamos a remoção do catalisador do produto sintetizado utilizando partição líquido-líquido e HPLC preparativo. De acordo com o cromatograma e o espectro de massa (**Figura 2**), o DBU não foi totalmente removido pela partição. Além disso, observamos que o rendimento final dos produtos de metilação foi reduzido na tentativa de purificação.

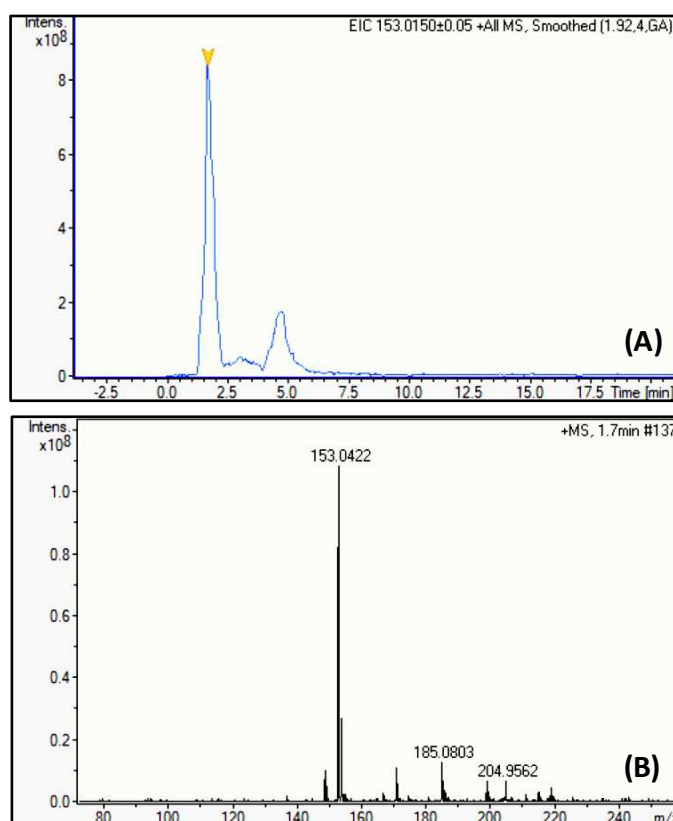


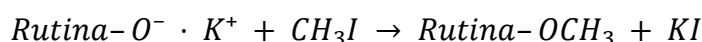
Figura 2 - Análise por LCMS Ion Trap da fração aquosa do ensaio de fracionamento por partição líquido-líquido para remoção do DBU presentes nas reações de metilação da rutina. Em (A) o cromatograma extraído do íon 153 e em (B) o espectro de MS1 indicando a presença do DBU em altas concentrações após o fracionamento por partição.

Devido às dificuldades encontradas na completa remoção do DBU, exploramos outras metodologias de síntese para otimizar o tempo e o rendimento da reação para os ensaios biológicos com *Anticarsia gemmatalis*. Dessa forma, propomos três protocolos práticos para a *O*-metilação da rutina utilizando iodeto de metila (CH_3I) e carbonato de potássio (K_2CO_3). A síntese utilizando iodeto de metila envolve um processo similar ao descrito para o DBU e DMC. Contudo, o iodeto de metila, devido à sua baixa temperatura de ebulição, é de fácil remoção do meio reacional. Na reação, o K_2CO_3 atua como base, desprotonando os grupos hidroxila da rutina e formando íons alcóxido altamente nucleofílicos. Esses íons alcóxido reagem com o CH_3I , substituindo o iodeto e formando derivados metilados da rutina, que podem variar em número de grupos metóxi dependendo das condições da reação (Torre et al., 2004; Kozłowska et al., 2017).

1. Desprotonação da Rutina:



2. Metilação da Rutina:



Reação de metilação com DMC/DBU

Os resultados obtidos com o DBU como catalisador mostraram uma eficiência significativa na metilação da rutina, corroborando estudos anteriores sobre a eficácia do DBU em reações de *O*-metilação (Straßmann et al., 2021). Os cromatogramas e espectros de massas confirmaram a presença de derivados mono, di e tri-metilados da rutina, com diferentes tempos de retenção e proporções. A predominância de produtos mono-metilados em comparação com os produtos di-metilados e tri-metilados confirmou a seletividade do DBU para a metilação de um único grupo hidroxila nas condições experimentais utilizadas neste estudo (**Figura 3 e Tabela 1**).

Este comportamento é consistente com a literatura, que sugere que a reatividade dos grupos hidroxila fenólicos da rutina varia, com alguns grupos sendo mais suscetíveis à metilação do que outros (Li et al., 2019). Além disso, a eficiência na formação de produtos mono-metilados é uma característica desejável, pois permite um controle mais preciso sobre a modificação estrutural da rutina (**Figura 3 e Tabela 1**). Essa seletividade é particularmente importante para os testes biológicos subsequentes, onde diferentes graus de metilação podem influenciar significativamente a atividade biológica dos compostos, especialmente no ensaio biológico com *Anticarsia gemmatalis*.

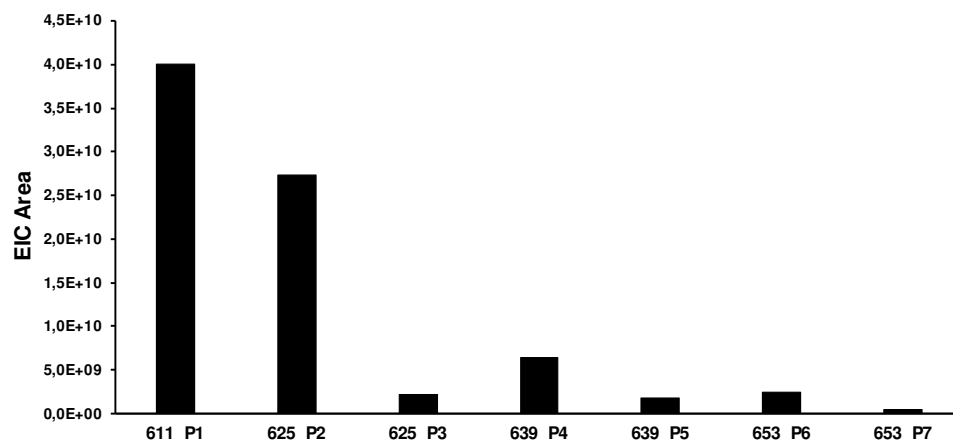


Figura 3 - Proporção dos produtos de metilação da Rutina utilizando DMC/DBU, indicando os íons m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações) e 653 (três metilações). Áreas dos cromatogramas extraídos dos íons foram obtidas dos picos cromatográficos da Figura 3. Mais de um pico com diferentes tempos de retenção (RT) para a mesma relação m/z são indicados.

A proporção dos produtos (**Figura 3**) foi determinada pela análise da área dos picos cromatográficos (**Figura 4**). Os valores percentuais dos produtos foram apresentados na Tabela 1, evidenciando uma maior quantidade de produto com uma metilação (36,56%) e menores quantidades para os produtos com duas metilações (10,25%) e três metilações (3,56%). Esses resultados sugerem uma eficiência maior na obtenção de produtos mono-metilados sob as condições experimentais utilizadas.

Tabela 1 - Valores percentuais dos produtos de metilação da rutina utilizando o catalizador DBU. Valores de abundância absoluta dos cromatogramas extraídos dos íons (EIC área) da figura 3 foram convertidos em valores relativos em percentual.

Peak	EIC	RT [min]	RA%
1	611_P1	21.7	49,629
2	625_P2	21.9	33,846
3	625_P3	24.0	2,7171
4	639_P4	25.7	8,0459
5	639_P5	29.1	2,2011
6	653_P6	27.1	3,0215
7	653_P7	30.6	0,5401

A análise dos resultados cromatográficos revelou também que a rutina não metilada (611 Da) permanece em uma quantidade significativa no meio reacional (Rt 21.7 min., 49,63%), o que é

esperado dada a presença inicial e a eficiência relativa do catalisador DBU. Mesmo após a reação de metilação, uma porção significativa da rutina pode permanecer não metilada devido à eficiência da reação e às condições específicas do experimento. Embora o DBU seja um catalisador eficaz para a metilação, nem todas as moléculas de rutina podem ser metiladas dentro do tempo de reação ou sob as condições específicas (temperatura, concentração do reagente, etc.). Portanto, uma quantidade substancial de rutina original pode permanecer inalterada.

Os produtos que apresentam uma metilação são identificados pelo íon de 625 Da (**Figura 4 e Figura 5B**). Dois picos distintos foram observados para esses produtos, com áreas relativas de 33,85% e 27,17%, respectivamente (**Tabela 1 e Figura 4**). A presença de dois picos diferentes para o mesmo íon (625 Da) indica que a metilação ocorreu em diferentes posições da molécula da rutina. Cada posição de metilação gera um isômero distinto, que pode ter um tempo de retenção diferente no cromatograma (**Figura 4**). O mesmo pode ser explicado para os demais íons 639 e 653 Da, que também apresentaram picos com tempos de retenção distintos e diferentes áreas relativas.

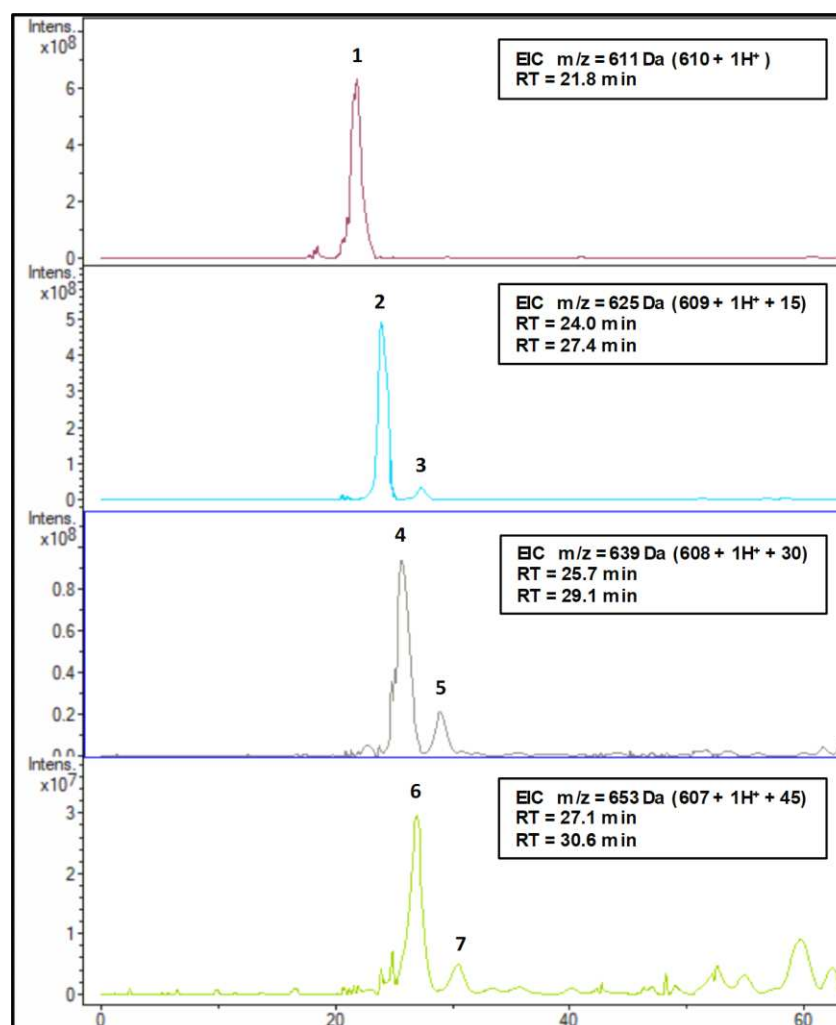


Figura 4 - Análises por LCMS Ion Trap dos produtos da metilação da rutina utilizando DMC e o catalizador DBU. Picos cromatográficos para os cromatogramas extraídos dos íons (EIC) são indicados para os íons m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações) e 653 (três metilações). Os tempos de retenção cromatográficos (RT) são indicados para os picos de 1 a 7 correspondendo a cada uma das transições.

Para obter informações estruturais detalhadas das posições de metilação da rutina, foram realizadas análises sequenciais para monitorar as fragmentações dos íons precursores m/z 611, 625, 639 e 653 (**Figura 5**). A fragmentação do íon precursor $[M+H]^+$ m/z 611 (**A**) revelou o fragmento m/z 303 $[M-146-162]^+$, característico pela perda sequencial de ramnose (146 Da) e glicose (162 Da), respectivamente. Da mesma forma, precursor $[M+H]^+$ m/z 625 (**B**) produziu o fragmento m/z 317 $[M-146-162+H]^+$, confirmando a eliminação desses dois açúcares. Já a fragmentação do íon precursor $[M+H]^+$ m/z 639 (**C**) produziu o fragmento m/z 331 $[M-146-162+H]^+$, confirmando a eliminação desses dois açúcares. Por fim, a fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 653 (**D**) gerou o fragmento m/z 345 $[M-146-162+H]^+$, também característico desses padrões de perdas neutras específicas.

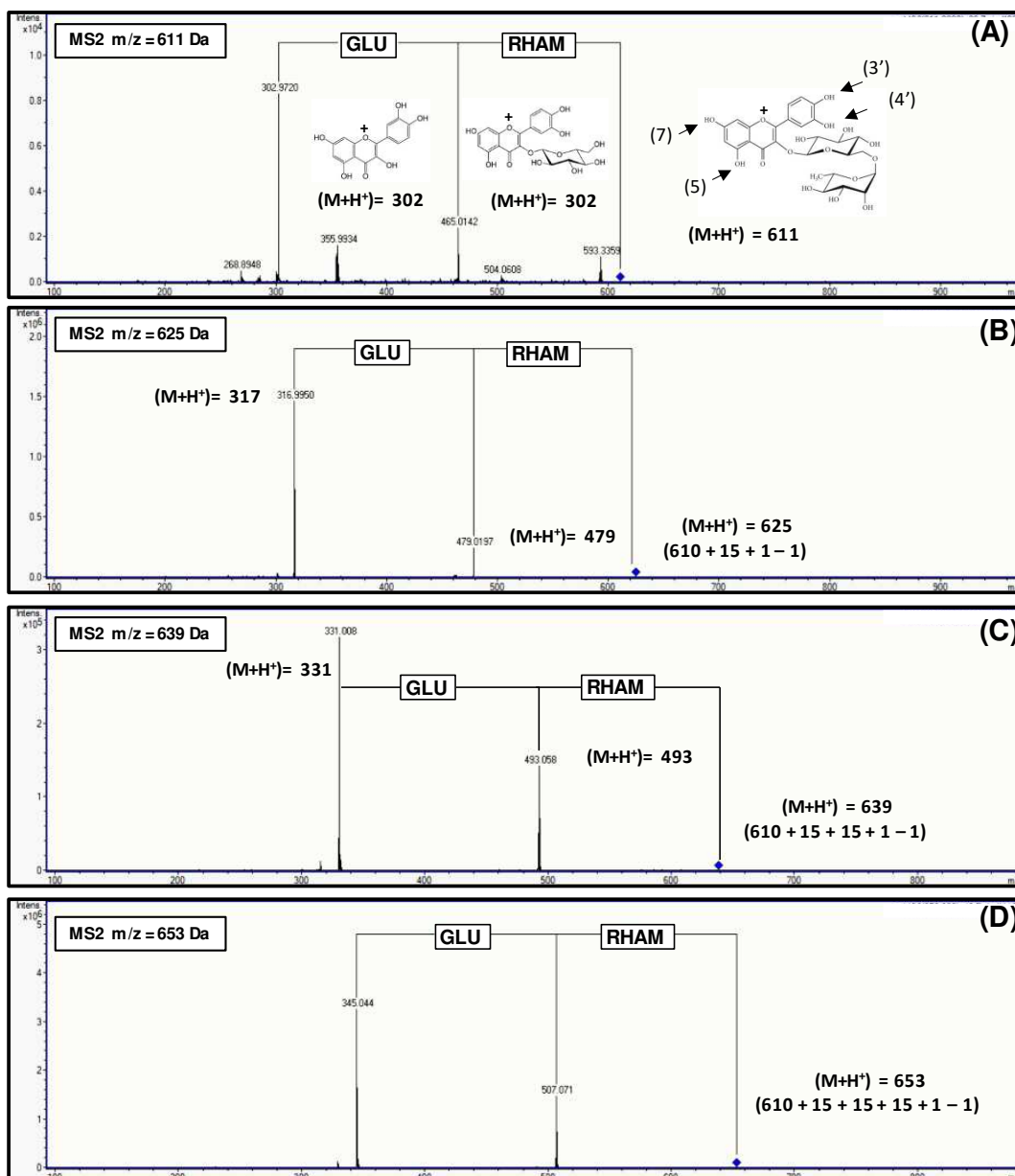


Figura 5 - Análises por LCMS Ion Trap dos produtos de metilação da rutina utilizando DMC e o catalizador DBU. O padrão de fragmentação dos produtos de metilação foram obtidos por espectrometria de massas do tipo LCMS MS2, usando um espectrômetro do tipo Ion Trap, para os picos observados na Figura 4. Em (A) o espectro de fragmentação MS2 do íon $m/z = 611$ Da; em (B) do íon $m/z = 625$ Da (uma metilação); em (C) do íon $m/z = 639$ (duas metilações); em (D) do íon 653 (três metilações). As setas no painel (A) indicam as posições disponíveis na aglicona para as reações de metilação. Nos painéis são indicadas as perdas neutras sequenciais de ramnose (146 Da, RHAM) e glicose (162 Da, GLU).

A fragmentação de flavonoides glicosilados por ESI-CAD resultou frequentemente na quebra da ligação *O*-glicosídica do açúcar ligado ao anel da aglicona, gerando um fragmento de alta

intensidade contendo a aglicona (**Figura 5**). Dessa forma, pouca informação estrutural sobre os anéis pode ser obtida a partir da fragmentação MS2. As estruturas das agliconas metiladas foram confirmadas por LCMS MS3, através do isolamento e fragmentação dos íons com diferentes números de metilações (**Figura 6**): $m/z = 303$ ($611 > 303$); em (**B**) do íon $m/z = 317$ ($625 > 317$); em (**C**) do íon $m/z = 331$ ($639 > 331$); e em (**D**) do íon $m/z = 345$ ($653 > 345$). Os fragmentos indicados foram previstos utilizando a plataforma CFM-ID ([//cfmid.wishartlab.com/](http://cfmid.wishartlab.com/)), indicando um fragmento de alta intensidade correspondente a uma perda do grupo metil: ($317-15 = 302$, **Figura 6B**); ($331-15 = 316$, **Figura 6C**); e ($345-15 = 330$, **Figura 6D**). As estruturas dos outros fragmentos também foram confirmadas (**Figura 6**). Em B, C e D da Figura 5, são apresentados os espectros de MS3 para agliconas com a mesma massa, mas com diferentes tempos de retenção (**Figura 4**). Como observado na Figura 3, a abundância relativa desses picos para a aglicona com mesma massa foi distinta, indicando diferentes taxas de metilação em função do sítio da reação. Por exemplo, para as moléculas metiladas de m/z 625 (uma metilação), observou-se maior abundância para o pico 2 em relação ao pico 3 (**Tabela 1**).

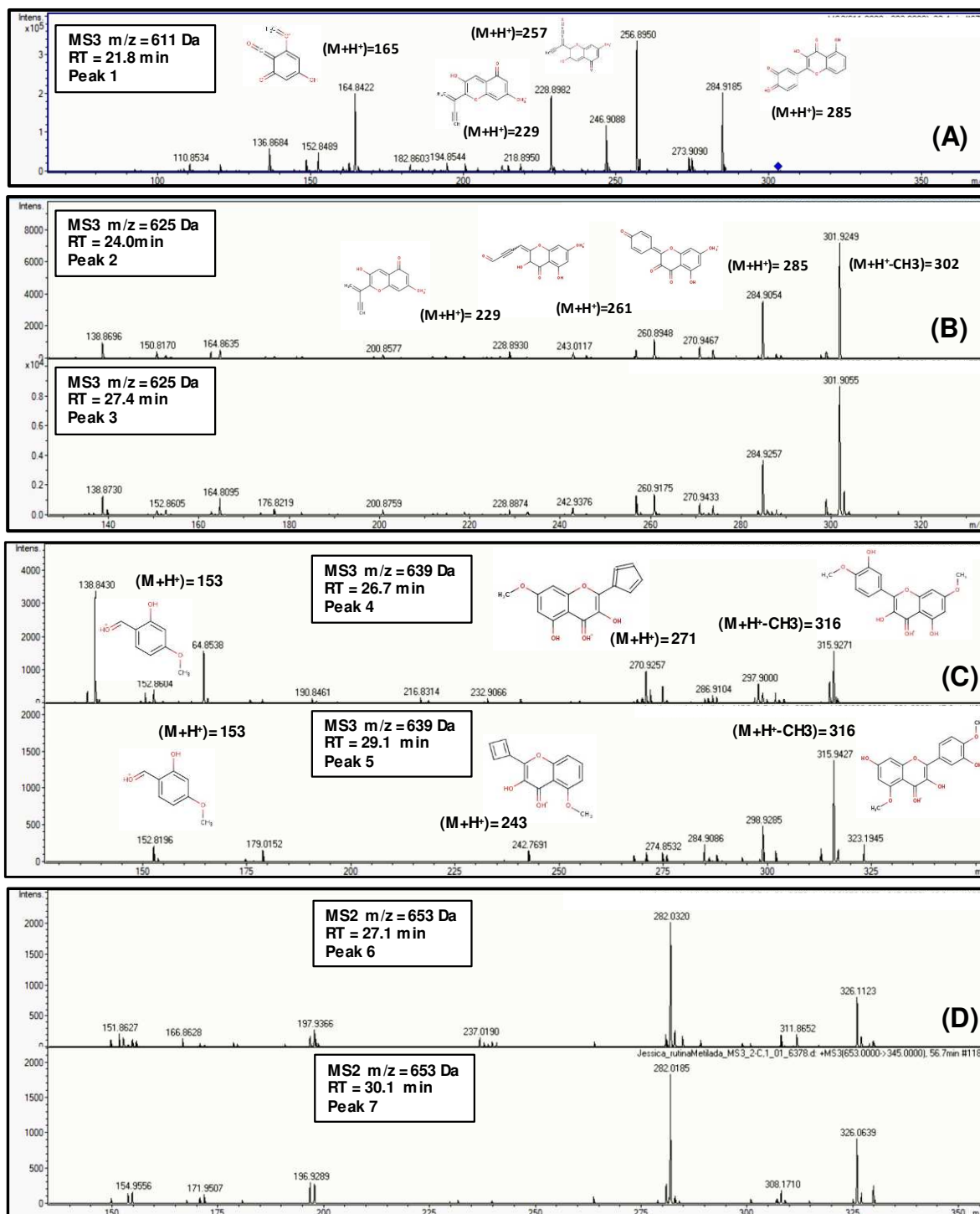


Figura 6 - Análises por LCMS Ion Trap dos produtos de metilação da rutina utilizando DMC e o catalizador DBU. O padrão de fragmentação das agliconas foram obtidos por espectrometria de massas do tipo LCMS MS3, usando um espectrômetro do tipo Ion Trap, para os picos observados na Figura 4. Em (A) o espectro de fragmentação MS3 do íon fragmento $m/z = 303$ ($611 > 303$); em (B) do íon $m/z = 317$ ($625 > 317$); em (C) do íon $m/z = 331$ ($639 > 331$); em (D) do íon 345 ($653 > 345$). A estrutura e o valores de massas dos fragmentos indicados foram preditos utilizando a plataforma CFM-ID (<https://cfmid.wishartlab.com/>).

Reação de metilação com iodeto de metila e carbonato de potássio

A utilização de iodeto de metila e carbonato de potássio para a metilação da rutina apresentou vantagens significativas, incluindo a facilidade de remoção dos subprodutos e a ausência de toxicidade associada quando comparado a metodologia utilizando o DBU. A eficiência desse método é corroborada por estudos que demonstraram a eficácia do K_2CO_3 em reações de metilação similares (Torre et al., 2004; Kozłowska et al., 2017).

Para avaliar a síntese dos derivados metilados de rutina, foram testadas três condições diferentes, variando apenas o solvente: acetona (Reação 1), MeOH/MeCN (Reação 2) e MeOH/acetona (Reação 3). Na reação utilizando acetona como solvente, a análise por LCMS indicou a presença de múltiplos produtos de metilação da rutina (**Figura 7**).

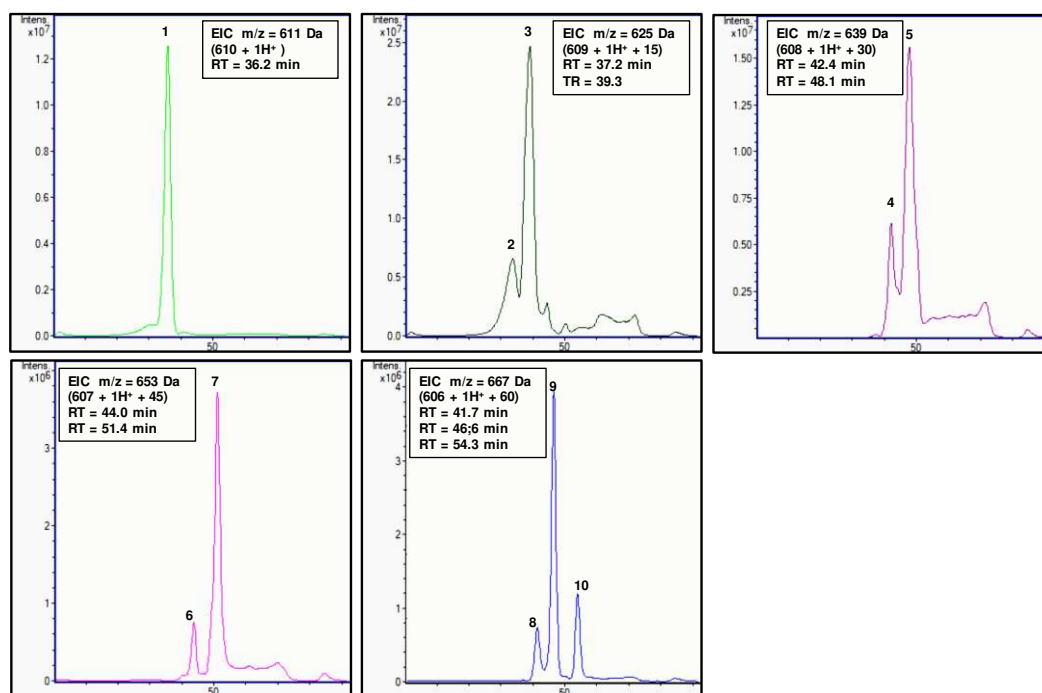


Figura 7 – Análise por LCMS dos produtos de metilação da Rutina com iodeto de metila (Reação 1). Os picos correspondem a m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações), 653 (três metilações) e 667 (quatro metilações).

A distribuição dos produtos revelou uma predominância de rutina mono-metilada e di-metilada, com quantidades menores para os produtos tri-metilados e tetra-metilados (**Figura 8**). As áreas percentuais dos produtos foram: rutina não metilada (m/z 611) com 12,34%, uma metilação (m/z 625) com 48,69%, duas metilações (m/z 639) com 29,75%, três metilações (m/z 653) com 4,58% e quatro metilações (m/z 667) com 4,64% (**Tabela 2**). A formação limitada de produtos altamente

metilados pode ser atribuída à natureza do solvente utilizado, que, conforme a literatura, tende a favorecer menos reações de metilação múltiplas em comparação com as misturas de solventes utilizadas.

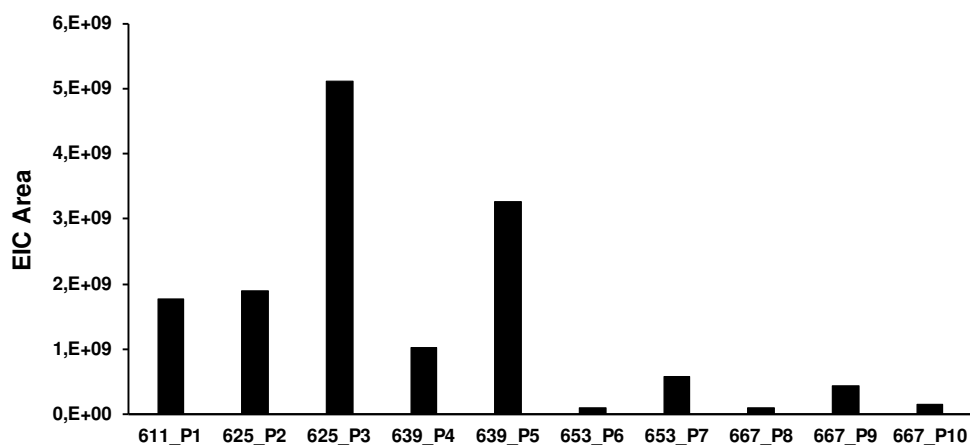


Figura 8 - Proporção dos produtos de metilação da Rutina utilizando iodeto de metila (Reação 1, solvente acetona), mostrando os íons correspondentes a m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações), 653 (três metilações) e 667 (quatro metilações).

Tabela 2 - Valores percentuais dos produtos de metilação da rutina com iodeto de metila (Reação 1).

Peak	EIC	RT [min]	RA%
1	611_P1	36.2	12,34393
2	625_P2	37.2	13,12026
3	625_P3	39.3	35,57261
4	639_P4	42.4	7,052346
5	639_P5	48.1	22,7018
6	653_P6	44.0	0,62238
7	653_P7	51.4	3,957611
8	667_P8	41.7	0,641091
9	667_P9	46.8	2,978665
10	667_P10	54.3	1,009307

Portanto, na primeira reação, observou-se uma predominância significativa de rutina mono-metilada e di-metilada, com quantidades menores de produtos tri-metilados e tetra-metilados. Esses resultados sugerem uma seletividade no método de metilação empregado, possivelmente influenciada pelo tipo de solvente utilizado, que neste caso foi acetona.

Na segunda reação, utilizando uma mistura de MeOH/MeCN como solvente, o cromatograma revelou a presença dos seguintes compostos na Figura 9:

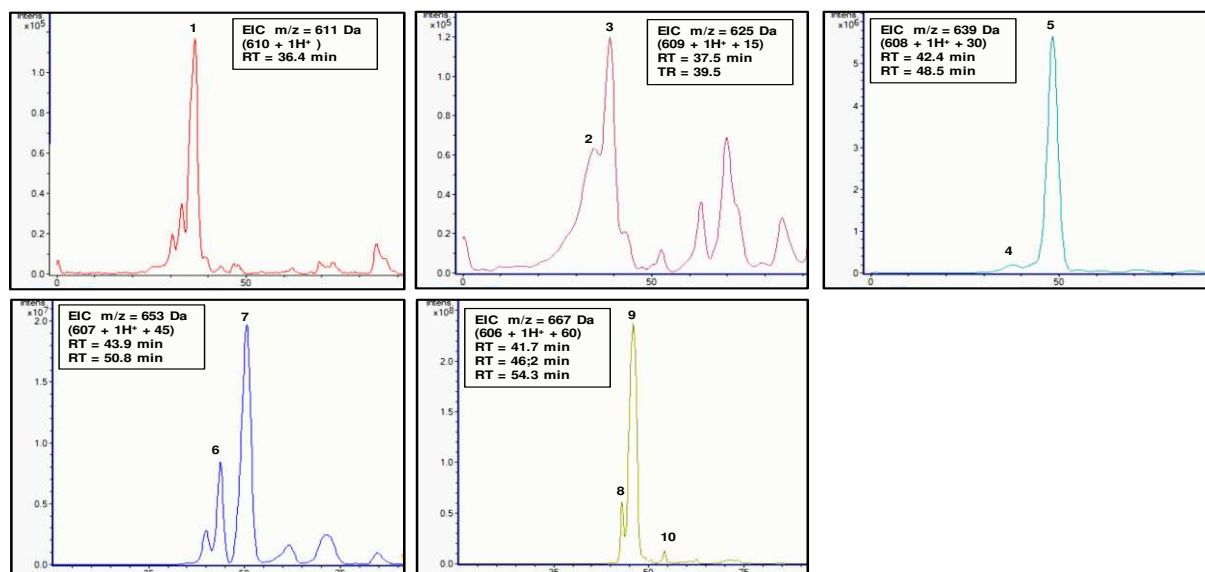


Figura 9 - Análise por LCMS dos produtos de metilação da Rutina com iodeto de metila (Reação 2). Os picos correspondem a m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações), 653 (três metilações) e 667 (quatro metilações).

Os resultados de LCMS revelaram uma diferença notável na distribuição dos produtos, com uma quantidade significativamente maior de produtos tetrametilados em comparação à primeira reação (**Figura 10**). Analisando as áreas percentuais dos produtos formados, observou-se que a rutina não metilada (m/z 611) apresentou 0,05%, enquanto os produtos com uma metilação (m/z 625) registraram 0,08%, duas metilações (m/z 639) 2,85%, três metilações (m/z 653) 9,29% e quatro metilações (m/z 667) 87,73% (**Tabela 3**). Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores, como os de Torre et al. (2004), que sugerem que a combinação de MeOH e MeCN pode aumentar a eficiência das metilações múltiplas.

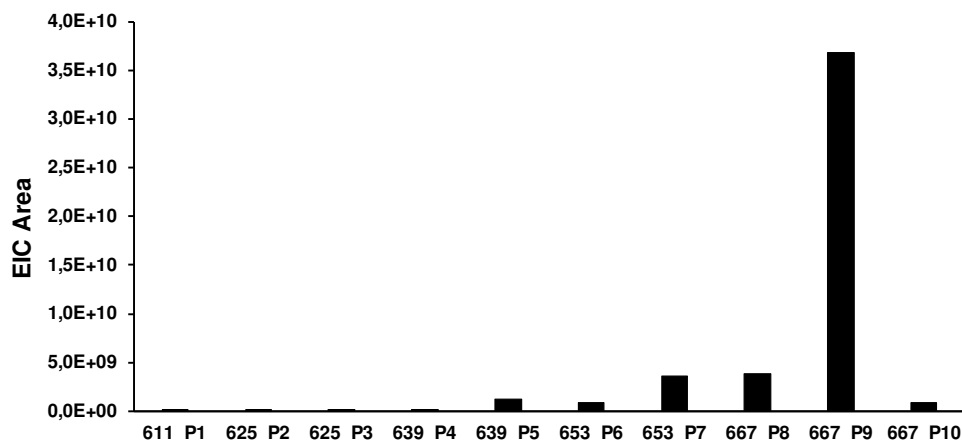


Figura 10 - Proporção dos produtos de metilação da Rutina utilizando iodeto de metila (Reação 2, MeOH/MeCN como solvente), mostrando os íons correspondentes a m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações), 653 (três metilações) e 667 (quatro metilações).

Tabela 3 - Valores percentuais dos produtos de metilação da rutina com iodeto de metila (Reação 2).

Peak	EIC	RT [min]	RA%
1	611_P1	36.4	0,050352
2	625_P2	37.2	0,025146
3	625_P3	39.3	0,05468
4	639_P4	42.4	0,258642
5	639_P5	48.5	2,586422
6	653_P6	43.9	1,84076
7	653_P7	50.7	7,451138
8	667_P8	41.7	8,086813
9	667_P9	46.6	77,79034
10	667_P10	54.2	1,855706

Na terceira reação, ao utilizar uma mistura de MeOH e acetona como solvente, o cromatograma revelou a formação de produtos mono, di, tri e tetrametilados (**Figura 11**).

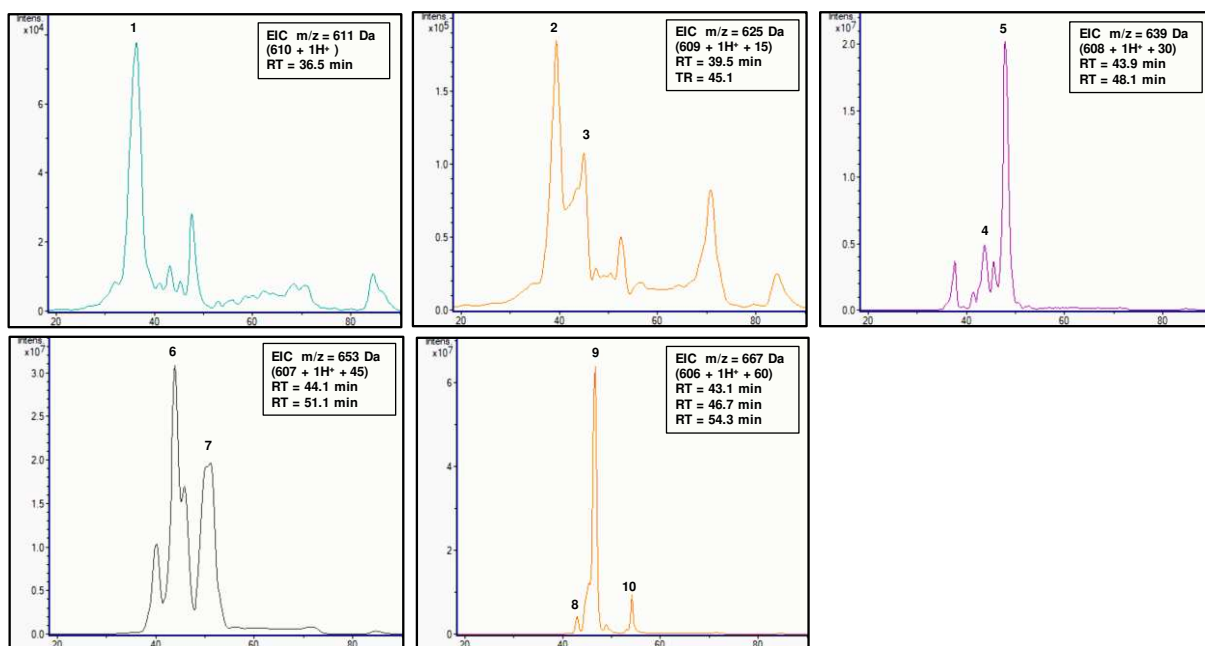


Figura 11 - Análise por LCMS dos produtos de metilação da Rutina com iodeto de metila (Reação 3). Os picos correspondem a m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações), 653 (três metilações) e 667 (quatro metilações).

Entretanto, foi observada uma tendência de distribuição mais equilibrada entre os produtos formados nesta reação (**Figura 12**). De acordo com os valores percentuais das áreas para cada composto, predominou o produto com três metilações (m/z 653) com 49,75%, enquanto os produtos com quatro metilações (m/z 667) representaram 34,46%, duas metilações (m/z 639) 15,46%, uma metilação (m/z 635) 0,25% e rutina não metilada (m/z 611) 0,08% (**Tabela 4**). A combinação de MeOH e acetona como solventes proporcionou uma síntese eficiente de produtos tri e tetra-metilados, semelhante ao observado na literatura por Kozłowska et al. (2017).

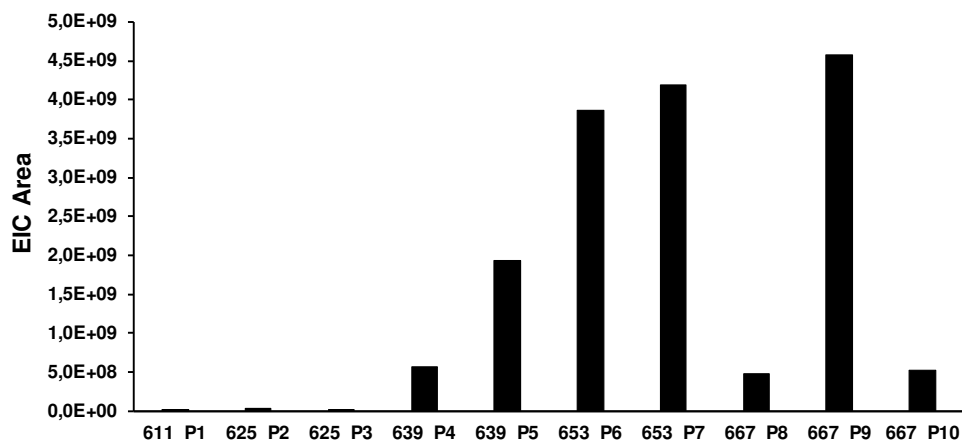


Figura 12 - Proporção dos produtos de metilação da Rutina utilizando iodeto de metila (Reação 3, MeOH/acetona como solvente), mostrando os íons correspondentes a m/z 611 (rutina não metilada), 625 (uma metilação), 639 (duas metilações), 653 (três metilações) e 667 (quatro metilações).

Tabela 4 - Valores percentuais dos produtos de metilação da rutina com iodeto de metila (Reação 3).

Peak	EIC	RT [min]	RA%
1	611_P1	36.4	0,07685
2	625_P2	39.5	0,179616
3	625_P3	45.1	0,073718
4	639_P4	43.9	3,550959
5	639_P5	48.1	11,91376
6	653_P6	44.1	23,88391
7	653_P7	51.0	25,86528
8	667_P8	43.1	2,975625
9	667_P9	46.7	28,25784
10	667_P10	54.3	3,222437

A comparação dos dados experimentais com a literatura mostra algumas similaridades e diferenças importantes. A acetona é um solvente eficaz para reações de metilação, mas a formação de produtos altamente metilados pode ser limitada em comparação com misturas de solventes. A mistura de MeOH e MeCN, conforme a literatura, pode aumentar a eficiência de metilações múltiplas, o que é consistente com os resultados observados, mostrando uma maior proporção de produtos tri e tetrametilados (Torre et al., 2004). De fato, em nossas metodologias utilizando o iodeto de metila na presença de MeOH/MeCN permitiu a obtenção de produtos tetrametilados, como indicado por

exemplo nas figuras 11 e 12, com a observação de íons de m/z 667. Os espectros de fragmentação de MS2 e MS3 confirmaram a presença de 4 metilações na rutina (**Figura 13**).

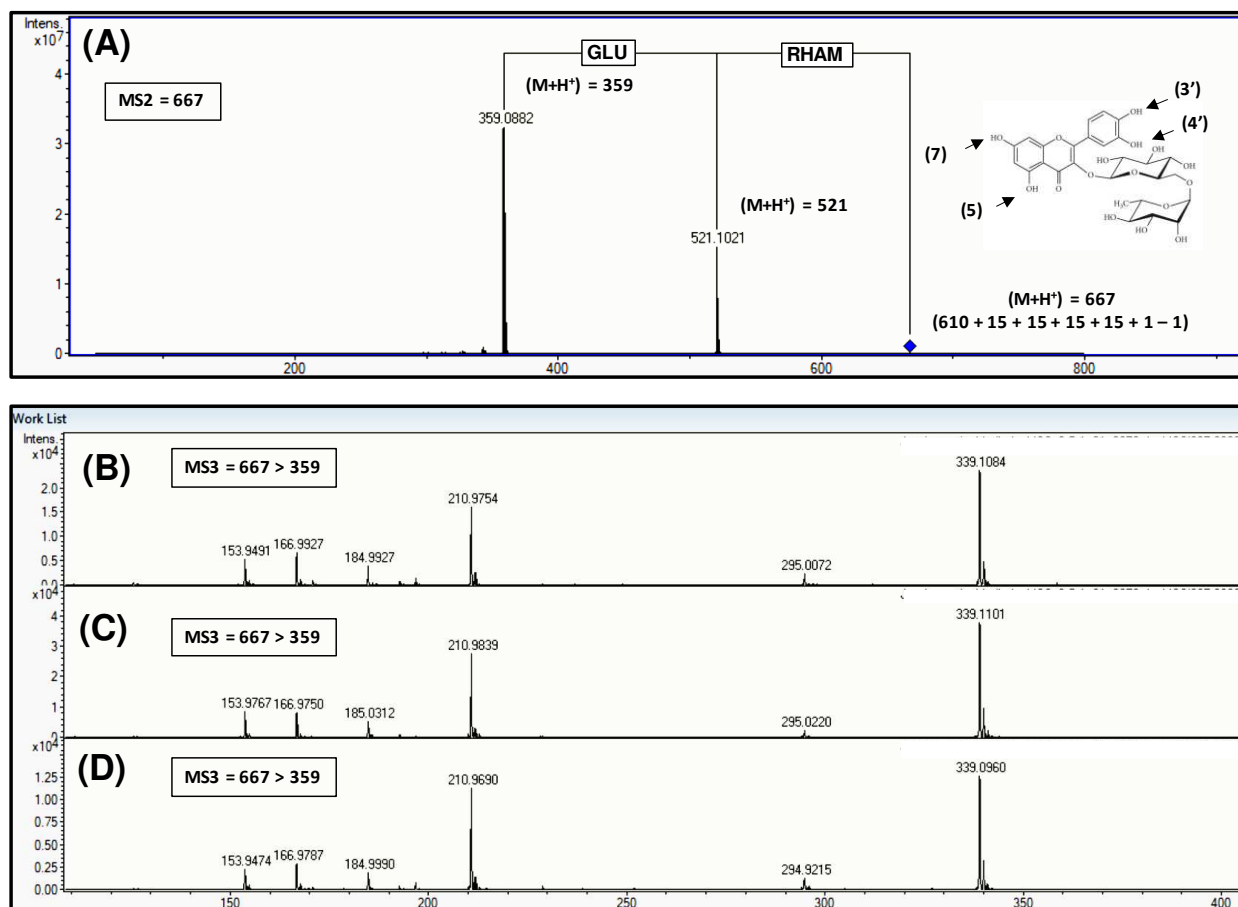


Figura 13 - Análises por LCMS Ion Trap dos produtos de metilação da rutina utilizando o iodeto de metila. O padrão de fragmentação das agliconas foram obtidos por espectrometria de massas do tipo LCMS MS e MS3, usando um espectrômetro do tipo Ion Trap, para os picos observados na Figura 11). Em (A) o espectro de fragmentação MS2 do íon m/z = 667 (quatro metilações). As setas no painel (A) indicam as posições disponíveis na aglicona para as reações de metilação. Nos painéis são indicadas as perdas neutras sequenciais de ramnose (146 Da, RHAM) e glicose (162 Da, GLU). Em (B), (C) e (D) são indicados os espectros de fragmentação MS3 da aglicona tetrametilada m/z = 359 Da para os picos cromatográficos 8, 9 e 10 da Figura 11.

Portanto, a escolha do solvente tem um impacto significativo na distribuição dos produtos metilados. Este estudo confirma as observações de Kozłowska et al. (2017), que demonstraram que a mistura de solventes pode influenciar a formação de produtos metilados específicos. A mudança de solventes afeta significativamente a distribuição dos produtos de metilação da rutina. A acetona favorece a formação de produtos mono e dimetilados, enquanto as misturas de MeOH/MeCN e

MeOH/acetona promovem uma metilação mais extensa, resultando em maiores quantidades de produtos tri e tetrametilados. Estes resultados estão em linha com estudos prévios, confirmando que a escolha do solvente é crucial para controlar o grau de metilação desejado.

Posição dos grupos *O*-metilados

Neste estudo não foi possível realizar a caracterização estrutural detalhada dos compostos sintetizados, sobretudo levando em consideração a posição dos grupos *O*-metilados. Entretanto, a literatura sugere que a posição dos grupos *O*-metilados pode ser explicada pela ordem de reatividade das hidroxilas fenólicas. Em estudos realizados por Straßmann et al. (2021) com quercetina, foi observado que a ordem de metilação depende da acidez dos grupos OH fenólicos, sendo que os grupos mais ácidos são geralmente metilados primeiro. Especificamente, o grupo na posição 5-OH da quercetina é menos ácido devido à sua forte ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonila na posição 4, o que dificulta sua metilação. Além disso, a comparação dos valores de pKa (**Tabela 5**) das hidroxilas fenólicas da quercetina indica que a desprotonação ocorre preferencialmente na seguinte ordem: 4'OH > 7OH > 3'OH > 3OH > 5OH (Lemańska et al., 2001; Tatsuzaki et al., 2018).

Tabela 5 - Valores de pKa atribuídos às hidroxilas fenólicas dos flavonoides Quercetina e Rutina de acordo com a literatura.

Hidroxila fenólica	pKa		pKa	
	Quercetina	Lit. Ref.	Rutina	Lit. Ref.
3OH	9.9	[1] [2]		
5OH	11.5	[1] [2]		
7OH	8.5	[1] [2]	6.3	[3]
4'OH	7.9	[1] [2]	5.2	[3]
3'OH	9.5	[1] [2]	5.3	[3]

[1]Lemańska et al. (2001); [2] Tatsuzaki et al. (2018); [3] Sancineto et al. (2021).

Analogamente, para a rutina, identificamos três grupos hidroxila nas posições 7, 3' e 4' da aglicona, que possuem caráter ácido. Cálculos de pKa realizados por Sancineto et al. (2021) estimaram valores de 6,3 para o grupo hidroxila em C7, e 5,3 e 5,2 para os grupos hidroxila em 3' e 4', respectivamente (**Tabela 5**). Dessa forma, a ordem de reatividade estimada para as hidroxilas fenólicas da rutina seria: 4'OH > 3'OH > 7OH > 5OH. É importante ressaltar que o caráter básico do grupo presente na posição 3 da rutina pode promover a ionização dos grupos hidroxila mencionados

acima, aumentando assim sua solubilidade. Essas conclusões abrem possibilidades para o desenvolvimento de novas metodologias de síntese e para a avaliação por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

Estudos recentes sugerem que a seletividade da metilação em flavonoides como a rutina pode ser influenciada não apenas pela acidez dos grupos OH fenólicos, mas também por fatores estéricos e eletrônicos que governam a acessibilidade desses sítios reativos. Por exemplo, investigações detalhadas por Tatsuzaki et al., (2018) destacaram que a presença de grupos substituintes nas posições orto e para ao grupo hidroxila fenólico pode modificar significativamente a reatividade desses sítios durante a metilação. Além disso, a ordem de metilação dos flavonoides pode ser guiada pela estrutura tridimensional da molécula e pela presença de interações não-covalentes, como ligações de hidrogênio intramoleculares, que podem estabilizar ou desestabilizar intermediários de reação. Estudos de modelagem molecular e dinâmica computacional têm sido empregados para elucidar esses aspectos estruturais e reativos em flavonoides, oferecendo insights valiosos para o planejamento racional de sínteses mais eficientes e seletivas (Lemańska et al. (2001); Tatsuzaki et al., 2018).

Portanto, além da consideração dos valores de pKa e da acidez relativa dos grupos fenólicos, a investigação estrutural mais profunda das interações moleculares e das propriedades conformacionais da rutina e seus derivados metilados é crucial para avançar no entendimento da regioseletividade e na aplicação desses compostos em aplicações biológicas.

Ensaio biológico com *Anticarsia gemmatalis*

Os ensaios de avaliação da atividade biológica dos compostos sintetizados pela reação utilizando DMC e DBU foram realizados sem purificação, utilizando como controle o mesmo conjunto reacional sem a presença da rutina. No entanto, observamos uma elevada mortalidade das lagartas nos primeiros dias de alimentação, indicando uma alta toxicidade do catalisador DBU para lagartas alimentadas com os controles. Dessa forma, como a reação de metilação mediada pelo DBU limitou a geração de produtos di-, tri- e tetra-metilados e inviabilizou os ensaios biológicos, foi adotada uma metodologia alternativa de metilação baseada no iodeto de metila, visando otimizar o tempo e o rendimento da reação para os ensaios biológicos com *A. gemmatalis*.

Nesse contexto, a estratégia de metilação da rutina com iodeto de metila em acetona foi ajustada para aumentar a quantidade de produtos disponíveis para o ensaio biológico. Após o ajuste, uma alíquota do material foi reservada para análise em LCMS. Como resultado, observou-se múltiplas metilações, com uma distribuição mais homogênea entre mono-, di-, tri- e tetra-metilações, quando comparado com os ensaios anteriores com acetona. Inicialmente, quando a reação de

metilação da rutina foi realizada inicialmente com 20 mg de rutina, predominavam compostos monometilados devido à dinâmica específica de uma reação em menor escala (**Figura 8**). Após ajustar a quantidade de rutina para 400 mg e proporcionalmente os reagentes, observamos que a maior disponibilidade de agentes metilantes e a intensificação das interações moleculares favoreceram múltiplas metilações (**Figura 14**).

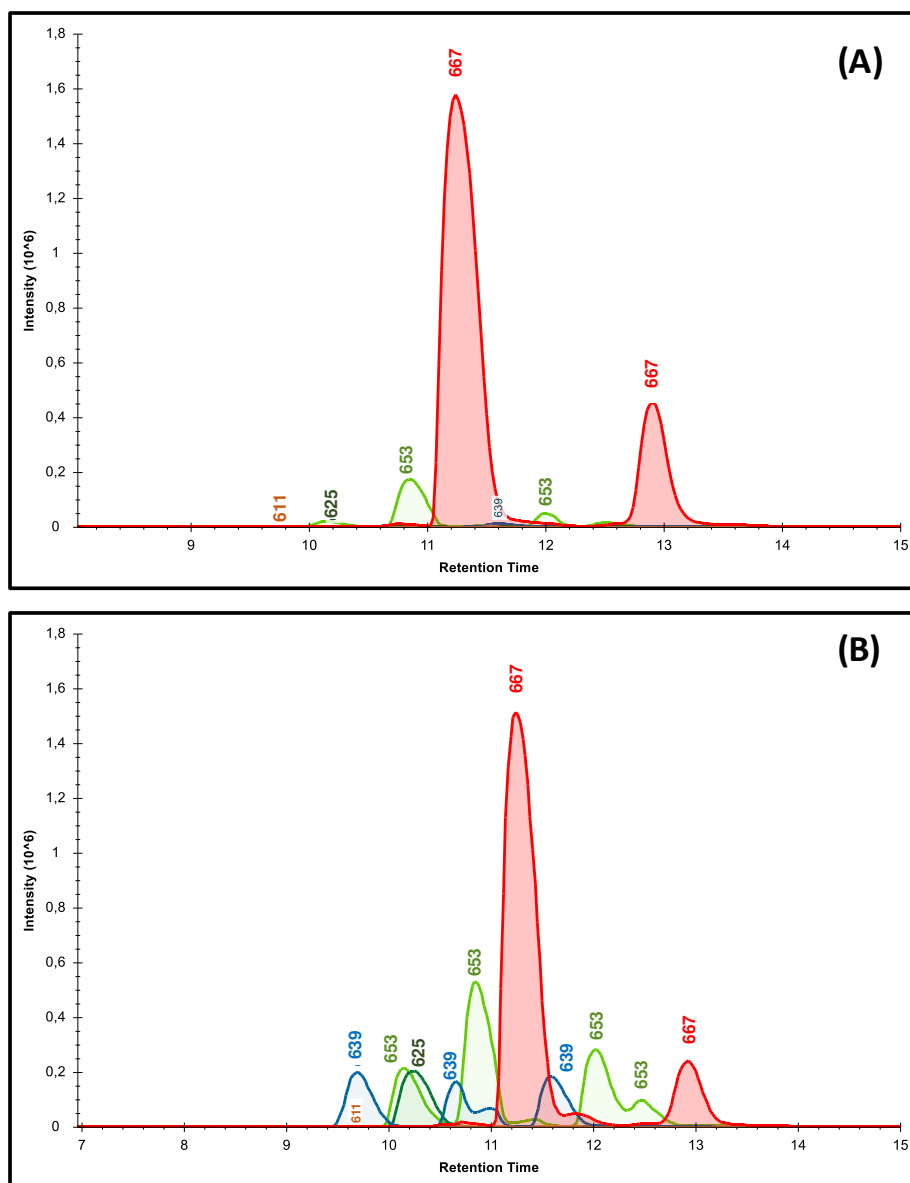


Figura 14 - Análise por LCMS QqQ dos produtos de metilação da rutina com iodeto de metila. Em (A) reação de metilação na presença de MeOH/MeCN e em (B) na presença de acetona. Os picos correspondem ao extracted ion chromatogram (EIC) para as transições m/z 611 > 303 (rutina não metilada), 625 > 317 (uma metilação), 639 > 331 (duas metilações), 653 > 345 (três metilações) e 667 > 359 (quatro metilações).

Além disso, foi constatado que o uso de MeOH como solvente na Reação 2 permitiu a solubilização dos reagentes presentes no sistema de filtragem para purificação, resultando em mortalidade total das lagartas no primeiro dia do ensaio biológico (dados não mostrados), inviabilizando o ensaio. Portanto, concluímos que a utilização de acetona como solvente na reação de metilação foi eficaz na remoção de interferentes, conforme observado nos controles utilizados nas dietas das lagartas (**Tabela 6**). Nas Figuras 15A e 15B, também é possível verificar que a remoção dos interferentes foi eficiente e não afetou o desenvolvimento das lagartas, resultando em pupas saudáveis com pesos similares.

Tabela 6 - Porcentagem de sobrevivência das lagartas de *Anticarsia gemmatalis* após 20 dias de alimentação com diferentes tratamentos.

Tratamentos	Sobreviventes Iniciais	Mortos Finais	Vivos Finais	Porcentagem de Sobrevivência (%)
Controle Água	32	1	31	96.88
Controle Reagente	32	0	32	100
Controle Positivo	32	32	0	0
Síntese	32	32	0	0

Os resultados do ensaio biológico indicam que a metilação da rutina altera significativamente sua toxicidade para *Anticarsia gemmatalis*. Esses achados estão em conformidade com estudos anteriores que demonstraram que modificações estruturais em compostos fenólicos podem aumentar sua eficácia biológica (Bouktaib et al., 2002; Cren-Olivé et al., 2002). A análise de sobrevivência utilizando o método Kaplan-Meier (**Figura 15A**) e da massa corporal das pupas (**Figura 15B**) indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0.05$). As curvas de sobrevivência mostraram que a mortalidade das lagartas foi mais acentuada nos primeiros 10 dias de experimento para os grupos tratados com os compostos metilados da síntese.

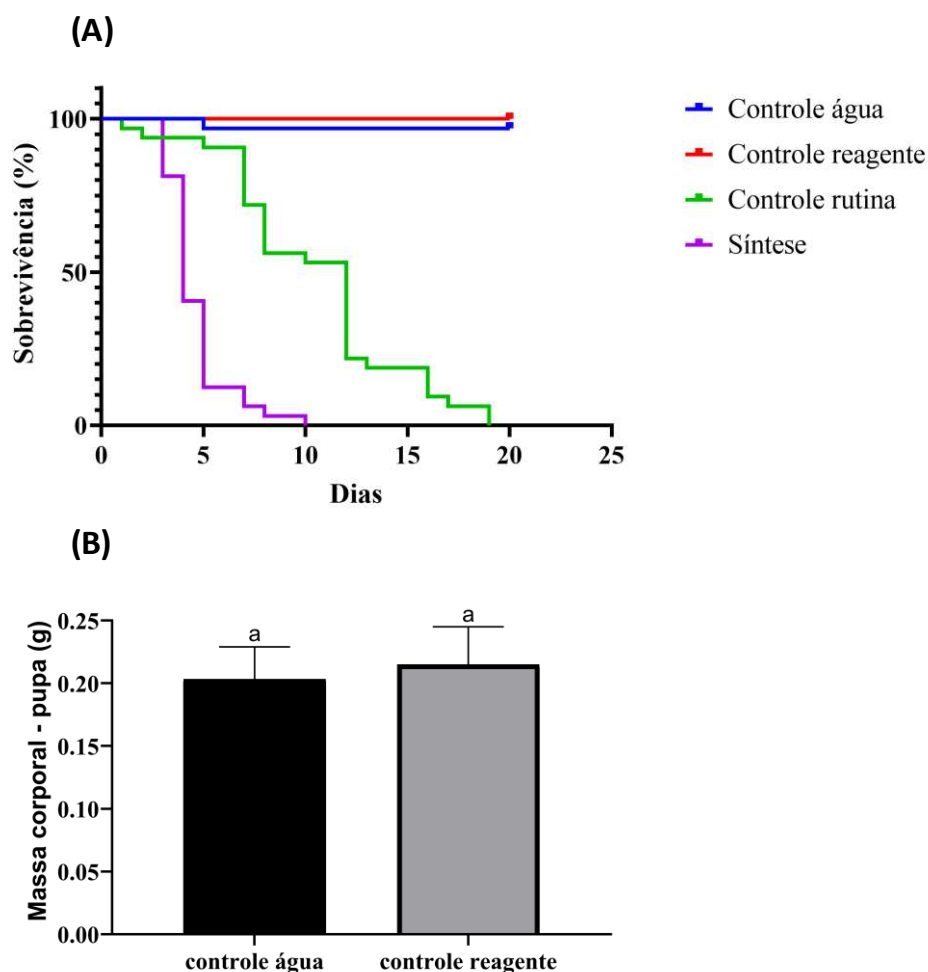


Figura 15 - Ensaio de sobrevivência de lagartas da soja *Anticarsia gemmatilis* alimentadas com dietas suplementadas com produtos de metilação da rutina. Em (A) o monitoramento da sobrevivência ao longo de tempo (dias). Em (B) o peso das pupas ao final do ciclo larval de 20 dias. Os tratamentos consistiram em: controle negativo 1, contendo água (dieta + H₂O), controle negativo 2, contendo meio reacional sem rutina (dieta + reagentes da síntese), controle positivo 1, contendo rutina 0,64% (dieta + rutina) e tratamento produtos da síntese 0,64% (dieta + produtos de metilação da rutina).

A análise de sobrevivência utilizando o método Kaplan-Meier e dos pesos após a pupação indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0.05$). No tratamento controle água, a maioria das lagartas sobreviveu ao longo de todo o experimento, exceto por uma (nº 1) que morreu no terceiro dia (**Figura 15**). No controle reagente, todas as lagartas sobreviveram durante o período experimental, sugerindo que os reagentes utilizados não prejudicaram a sobrevivência das lagartas. No grupo controle rotina, observou-se mortalidade a partir do segundo dia, resultando na perda total das lagartas até o fim do experimento (**Figura 15A**), destacando a

eficácia da rutina na redução da sobrevivência (Hoffmann-Campo et al., 2006). No tratamento de síntese, as lagartas começaram a morrer a partir do quarto dia, culminando na mortalidade completa até o décimo dia de experimento (**Figura 15A**). Os resultados indicaram que a substância sintetizada teve um impacto significativo na mortalidade e no desenvolvimento das lagartas, superando o controle de rotina, enquanto os controles água e reagente não demonstraram efeito relevante (**Figura 16**). A pesagem das pupas revelou uma média de 0,20g para o controle água e 0,21g para o controle reagente (**Figura 15B**). A eclosão das mariposas foi observada em ambos os tratamentos, sem a detecção de qualquer anomalia.

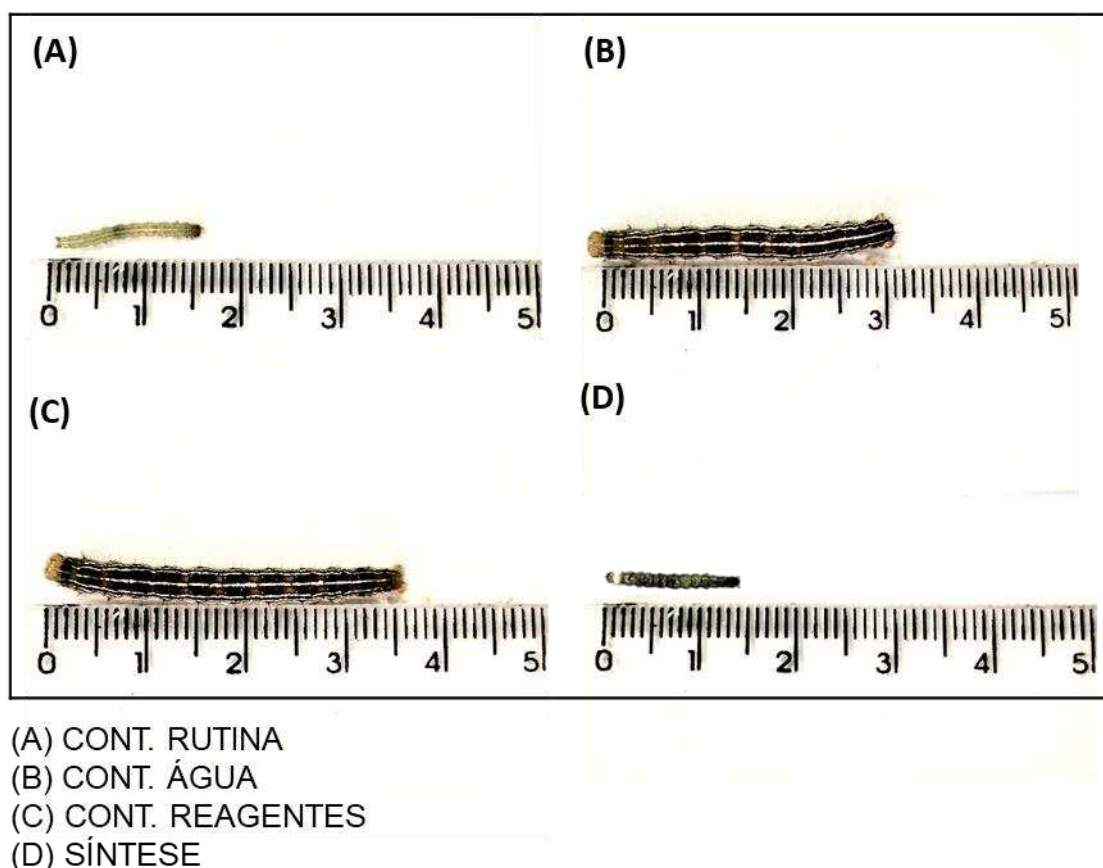


Figura 16 - Análise do desenvolvimento das lagartas da soja *Anticarsia gemmatilis* após 10 dias alimentadas com dietas suplementadas com os respectivos tratamentos: (A) controle rotina 0,64% (dieta + rutina), (B) controle água (dieta + H₂O), (C) controle reagentes (dieta + reagentes da síntese) e (D) síntese 0,64% (dieta + produtos de metilação da rutina).

Em suma, observamos que a mistura de compostos metilados derivados da rutina apresentou propriedades que afetaram negativamente a sobrevivência das lagartas da soja de maneira mais eficiente. Após 5 dias de avaliação, registramos uma mortalidade de 90% nas lagartas alimentadas

com os produtos de metilação da rutina. Esse nível de mortalidade só foi observado no tratamento com rutina pura após o décimo sexto dia de avaliação (**Figura 15A**). Conforme descrito na literatura, a maior toxicidade dos compostos metilados pode ser atribuída à maior hidrofobicidade dos anéis da aglicona e à redução da solubilidade em água. Essas características facilitam a penetração dos compostos através da cutícula e membranas dos insetos, permitindo que atinjam os tecidos internos com maior eficiência. A metilação dos grupos hidroxila livres nos flavonoides aumenta significativamente sua estabilidade metabólica e melhora o transporte através das membranas, facilitando a absorção e aumentando a biodisponibilidade oral (Koirala et al., 2016).

A quercetina é um flavonoide bem conhecido, cujas atividades biológicas têm sido amplamente documentadas. No entanto, seu uso terapêutico é limitado devido à sua baixa biodisponibilidade e solubilidade (Wen et al., 2017). Por outro lado, os flavonoides metilados na posição O estão amplamente presentes em plantas, embora seus níveis frequentemente sejam mais baixos do que os de seus precursores flavonoides. A ramnetina, uma quercetina naturalmente metilada na posição 7-O, é encontrada abundantemente em *Rhamnus petiolaris*, *Coriandrum sativum* e *Prunus cerasus*, e possui fortes propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, anti-colesterol, antibacterianas e anti-melanogênicas em comparação com sua forma não metilada (Koirala et al., 2016). Dessa forma, a forma metilada da rutina, como a isoramnetina 3-O-rutinosídeo, pode ser mais eficaz no mecanismo de resistência em genótipos de soja resistentes ao ataque de insetos (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024).

Em contraste, genótipos de soja resistentes a insetos pragas produzem elevadas quantidades tanto das formas metiladas quanto não metiladas da rutina (Gomez et al., 2020; Pinheiro et al., 2024). Nestes genótipos, a via de biossíntese de flavonóis metilados é fortemente desviada para a biossíntese da forma glicosilada e metilada da quercetina, a isoramnetina 3-O-rutinosídeo, destacando a importância das metilações dos flavonoides para sua plena atividade biológica. A metilação tem sido documentada como um fator que melhora a entrada dos flavonoides nas células e previne sua degradação, tornando-os agentes quimiopreventivos mais potentes do que os flavonoides não metilados (Wen et al., 2017). Além disso, a metilação pode modificar os mecanismos pelos quais os compostos interagem com os sistemas biológicos dos insetos, aumentando a afinidade dos compostos por receptores ou proteínas-alvo nas células dos insetos e, conseqüentemente, sua toxicidade (Li et al., 2019). Muitos insetos possuem sistemas enzimáticos de detoxificação que ajudam a metabolizar e excretar substâncias tóxicas, mas os flavonoides metilados são mais resistentes à degradação, tornando-se mais biodisponíveis e impactando a fisiologia intestinal dos insetos (Koirala et al., 2016).

Esses efeitos podem ter sido potencializados pela presença de flavonóis metilados em extratos de folhas do genótipo IAC 17, que foram adicionados às dietas das lagartas. As alterações histológicas nos tecidos intestinais das lagartas podem ter sido mais significativamente afetadas pela presença de flavonóis metilados, em concordância com os resultados observados para os produtos de síntese contendo diferentes formas de rutina metilada. A presença de flavonóis e flavonoides metilados pode promover alterações bioquímicas, interferindo na ingestão de alimentos pelas larvas, pois a energia utilizada na digestão pode ser desviada para a detoxificação desses flavonoides (Pereira et al., 2024). Além disso, a inibição das enzimas detoxificantes pode resultar em maior toxicidade para o organismo. Wang et al. (2019) mostraram que o flavanonol taxifolina inibiu a esterase de *Leptinotarsa decemlineata in vitro* (IC₅₀ de $2,6 \pm 0,3$ mg/L), e estudos *in vivo* revelaram que a taxifolina reduziu significativamente a atividade da esterase, mas diminuiu ligeiramente a atividade da glutathione-S-transferase. Outro estudo demonstrou que a crisina e a galangina reduziram a atividade da carboxilesterase, uma enzima associada à resistência a inseticidas, ao mesmo tempo em que aumentaram a atividade da glutathione-S-transferase (Pereira et al., 2024). Portanto, a rutina metilada pode ter afetado diretamente a atividade de enzimas proteolíticas envolvidas na digestão e na detoxificação de *Anticarsia gemmatilis*, como observado por Gomez et al. (2020).

Por fim, o controle de pragas em cultivos é uma questão crítica global devido aos impactos econômicos e ambientais dos pesticidas sintéticos. Inseticidas de origem vegetal, como os flavonoides, oferecem uma alternativa promissora devido ao seu baixo custo e impacto ambiental reduzido (Ahmed et al., 2022). Nossos estudos destacam que a eficácia dos flavonoides como inseticidas pode ser drasticamente melhorada por meio da metilação, aumentando sua estabilidade, biodisponibilidade e toxicidade contra insetos-praga. No entanto, para sua aplicação em larga escala, é crucial desenvolver métodos de produção eficientes e sustentáveis, além de avaliar sua eficácia e segurança em condições de campo. Estratégias integradas que combinam flavonoides metilados com outras práticas de manejo de pragas podem proporcionar um controle robusto e sustentável, promovendo práticas agrícolas mais seguras e ecológicas.

CONCLUSÕES

A síntese utilizando dimetil carbonato (DMC) como agente metilante e DBU como catalisador foi vantajosa por produzir uma maior proporção de derivados mono-metilados da rutina. No entanto, os ensaios biológicos foram dificultados pela toxicidade do catalisador, exigindo procedimentos mais complexos para a remoção completa dos componentes da reação. Em contraste, a metilação utilizando iodeto de metila resultou em uma maior diversidade de produtos metilados. A síntese ajustada com

acetona como solvente para os ensaios biológicos permitiu obter formas mono-, di-, tri- e tetra-metiladas da rutina, com uma maior proporção da forma tetra-metilada. A acetona também se mostrou eficiente na remoção dos componentes da reação, evitando interferências nos ensaios biológicos por simples filtração. Os ensaios biológicos mostraram que a metilação potencializa a redução da sobrevivência das lagartas, com a mortalidade atingindo 90% após cinco dias de exposição, dez dias antes em comparação com a rutina não metilada. Portanto, o uso de flavonoides metilados é uma estratégia promissora para o controle de insetos-praga mastigadores, podendo ser implementada por meio da modificação genética das plantas para superexpressão de metilases específicas para flavonoides.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, N., Alam, M., Saeed, M., et al. (2022). Botanical Insecticides Are a Non-Toxic Alternative to Conventional Pesticides in the Control of Insects and Pests. *Global Decline of Insects*, 11, 1-19.
- Bernini, R., Crisante, F., & Ginnasi, M. C. (2011). A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC). *Molecules*, 16(2), 1418-1425.
- Bouktaib, M., Lebrun, S., Atmani, A., & Rolando, C. (2002). Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions. *Tetrahedron*, 58, 10001–10009.
- Chaaban, H., Zhang, W., Zhang, H., et al. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13203.
- Cren-Olivé, C., Lebrun, S., & Rolando, C. (2002). An efficient synthesis of the four mono methylated isomers of (+)-catechin including the major metabolites and of some dimethylated and trimethylated analogues through selective protection of the catechol ring. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 6*, 821–830.
- Fugi, C. G. Q., Lourenção, A. L., & Parra, J. R. P. (2005). Biology of *Anticarsia gemmatilis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agricola*, 62, 31–35.
- Gómez, J. D., Pinheiro, V. J., Silva, J. C., Romero, J. V., Merino-Cabrera, Y., Coutinho, F. S., ... & Ramos, H. J. (2020). Leaf metabolic profiles of two soybean genotypes differentially affect the survival and the digestibility of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 196-212.

- Gómez, J. D., Vital, C. E., Oliveira, M. G., & Ramos, H. J. (2018). Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *PloS One*, 13(10).
- Hoffmann-Campo, C. B., Ramos Neto, J. A., Oliveira, M. C. N. D., & Oliveira, L. J. (2006). Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1453-1459.
- Koirala, N., Thuan, N. H., Ghimire, G. P., Thang, D. V., & Sohng, J. K. (2016). Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 103-116.
- Kozłowska, J., Potaniec, B., Żarowska, B., & Anioł, M. (2017). Synthesis and biological activity of novel O-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. *Molecules*, 22(9), 1485.
- Lemańska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zieliński, R., Soffers, A. E., & Rietjens, I. M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(7), 869-881.
- Liu, X., Wang, Y., Chen, Y., Xu, S., Gong, Q., Zhao, C., Cao, J., & Sun, C. (2020). Characterization of a Flavonoid 3'/5'/7-O-Methyltransferase from *Citrus reticulata* and Evaluation of the In Vitro Cytotoxicity of Its Methylated Products. *Molecules*, 25(4), 858. doi: 10.3390/molecules25040858. PMID: 32075249; PMCID: PMC7070609.
- Ouk, S., Thiebaud, S., Borredon, E., & Legars, P. (2002). O-Methylation of phenolic compounds with dimethyl carbonate under solid/liquid phase transfer system. *Tetrahedron Lett.* 43, 2661–2663.
- Ouk, S., Thiébaud, S., Borredon, E., & Le Gars, P. (2003). High performance method for O-methylation of phenol with dimethyl carbonate. *Appl. Catal.* 241, 227–233.
- Pinheiro, V. J., Gómez, J. D., Gouveia, A. S., Coutinho, F. S., Teixeira, R. M., Loriato, V. A., ... & Ramos, H. J. (2024). Gene expression, proteomic, and metabolic profiles of Brazilian soybean genotypes reveal a possible mechanism of resistance to the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *Arthropod-Plant Interactions*, 1-18.
- Piubelli, G. C., Hoffmann-Campo, C. B., Moscardi, F., Miyakubo, S. H., & Neves De Oliveira, M. C. (2005). Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*?. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 1509-1525.

Sancineto, L., Ostacolo, C., Ortega-Alarcon, D., Jimenez-Alesanco, A., Ceballos-Laita, L., Vega, S., ... & Santi, C. (2021). L-arginine improves solubility and ANTI SARS-CoV-2 Mpro activity of Rutin but not the antiviral activity in cells. *Molecules*, 26(19), 6062.

Shieh, W. C., Dell, S., & Repic, O. (2001). 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) and microwave-accelerated green chemistry in methylation of phenols, indoles, and benzimidazoles with dimethyl carbonate. *Org. Lett.* 3, 4279–4281.

Silva-Junior, N. R., Cabrera, Y. M., Barros, R. A., & Oliveira, M. G. A. (2022). Use of Protease Inhibitors as a Promising Alternative for Pest Control. In *Natural Products as Enzyme Inhibitors* (pp. 137-151). Springer Nature.

Silva, R. F. B., Viña, A., Moran, E. F., Dou, Y., Batistella, M., & Liu, J. (2021). Socioeconomic and environmental effects of soybean production in metacoupled systems. *Scientific Reports*, 11(1), 18662.

Souto, A. L., Sylvestre, M., Tölke, E. D., Tavares, J. F., Barbosa-Filho, J. M., & Cebrián-Torrejón, G. (2021). Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. *Molecules*, 26(16), 4835.

Straßmann, S., Brehmer, T., Passon, M., & Schieber, A. (2021). Methylation of cyanidin-3-O-glucoside with dimethyl carbonate. *Molecules*, 26(5), 1342.

Tatsuzaki, J., Ohwada, T., Otani, Y., Inagi, R., & Ishikawa, T. (2018). A simple and effective preparation of quercetin pentamethyl ether from quercetin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14(1), 3112-3121.

Torre, M. D., Rodrigues, A. G., Tomé, A. C., Silva, A. M., & Cavaleiro, J. A. (2004). [60] Fullerene–flavonoid dyads. *Tetrahedron*, 60(16), 3581-3592.

Tundo, P., Musolino, M., & Aricò, F. (2018). The reactions of dimethyl carbonate and its derivatives. *Green Chem.* 20, 28–85.

War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1306-1320.

Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., & Yang, B. (2016). Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*.

Wen, X., & Walle, T. (2006). Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 1786–1792.