



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Carlos Henrique Zanini Martins

Alcaloides pirrolizidínicos em mariposas Arctiinae Neotropicais: Efeitos sobre o desempenho, sequestro, metabolismo e defesa química contra predadores.

Pyrrolizidine alkaloids in Neotropical Arctiinae moths: Effects on performance, sequestration, metabolism and chemical defense against predators.

CAMPINAS

2015

Carlos Henrique Zanini Martins

Alcaloides pirrolizidínicos em mariposas Arctiinae Neotropicais: Efeitos sobre o desempenho, sequestro, metabolismo e defesa química contra predadores.

Pyrrolizidine alkaloids in Neotropical Arctiinae moths: Effects on performance, sequestration, metabolism and chemical defense against predators.

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.*

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Functional and Molecular Biology, in the area of Biochemistry.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto Trigo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO  
ALUNO CARLOS HENRIQUE ZANINI MARTINS, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. JOSÉ ROBERTO TRIGO.

CAMPINAS

2015

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M366a Martins, Carlos Henrique Zanini, 1982-  
Alcaloides pirrolizidínicos em mariposas Arctiinae Neotropicais : efeitos sobre o desempenho, sequestro, metabolismo e defesa química contra predadores / Carlos Henrique Zanini Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: José Roberto Trigo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Relação inseto-planta. 2. Defesas de plantas. 3. *Utetheisa ornatrix*. 4. Boraginaceae. 5. *Crotalaria*. I. Trigo, José Roberto, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Pyrrolizidine alkaloids in Neotropical Arctiinae moths : effects on performance, sequestration, metabolism and chemical defense against predators

**Palavras-chave em inglês:**

Insect-plant relationships

Plant defenses

*Utetheisa ornatrix*

Boraginaceae

*Crotalaria*

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

José Roberto Trigo [Orientador]

Renato Crespo Pereira

Karina Lucas Silva Brandão

Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda

Lucas Augusto Kaminski

**Data de defesa:** 16-10-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 16 de outubro de 2015.

Prof. Dr. José Roberto Trigo

---

Prof. Dr. Renato Crespo Pereira

---

Profa. Dra. Karina Lucas Silva Brandão

---

Prof. Dr. Paulo Cesar Muniz de Lacerda Miranda

---

Prof. Dr. Lucas Augusto Kaminski

---

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa,  
que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais e avós, por todo o suporte e incentivo durante essa fascinante trajetória científica e de autoconhecimento percorrida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Dr. José Roberto Trigo, por fornecer todas as condições para o desenvolvimento deste trabalho e me mostrar como os caminhos da natureza podem ser desvendados em termos químicos, além do conhecimento e experiência transmitidos durante meu doutorado e a amizade estabelecida, que foram muito importantes para meu crescimento intelectual.

Aos Programas de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Funcional e Pós-Graduação em Ecologia, bem como seus funcionários, por toda a estrutura e apoio fornecido.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Aos membros da Banca de Exame de Qualificação, os Professores Doutores Tomamasa Yano, Rodrigo Cogni e o Paulo Cesar M. L. Miranda, pelas importantes sugestões na primeira versão da tese.

Aos membros da Banca de Exame de Doutorado, os Professores Doutores Renato Crespo Pereira, Karina Lucas Silva Brandão, Paulo Cesar M. L. Miranda, Sebastian Felipe Sendoya Echeverry, Lucas A. Kaminski, João Vasconcellos-Neto e Gustavo Quevedo Romero pela participação e valiosas sugestões para o trabalho.

A Profa. Dra. Vera N. Solferini e a Beatriz P. Cunha, do Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, pela colaboração na realização da análise filogenética das espécies de *Crotalaria* utilizadas no trabalho.

A toda minha família, principalmente aos meus pais, José Carlos Martins e Luzia Teresa Zanini Martins, pelo apoio e exemplo de superação e por me ensinarem que a felicidade está na simplicidade de pequenos gestos. Grande parte do meu crescimento pessoal

e profissional é um reflexo da bela relação de vida que temos e agradeço imensamente por toda auxílio, amor, confiança, sabedoria e conselhos transmitidos.

À Diego Stéfani Martinez e Rodrigo D. Gomes, pela evolução de uma amizade que teve início durante a graduação na UFMS e que se consolidou após nossa chegada à UNICAMP. Sou extremamente grato por toda a ajuda de vocês em vários aspectos, mas principalmente pelo fato de compartilharmos durante mais de uma década inúmeros momentos de alegria, tristeza, superação, dificuldades e sucesso, que foram importantes para moldar nossos atos em diferentes momentos de nossas vidas e que contribuíram para a formação de cada um.

Aos integrantes do Laboratório de Ecologia Química, pela convivência e troca de experiências, Alberto Arab, Mariana Stanton, Adriano Mariscal, Milton Cordova, Pedro Maia, Danilo Reali, Wesley Monteiro, Luiz Mosquera, Daniela Guedes, Julia Cabral. Agradeço especialmente a querida Kamila Massuda, Martin Pareja e Diomar Verçosa, que me ajudaram de várias formas em épocas diferentes, mas principalmente pela amizade, companheirismo, e inúmeras conversas em momentos complicados.

Ao Técnico de Campo do Laboratório de Ecologia Química, José Carlos Silva, pela ajuda no decorrer deste trabalho, mas principalmente pela amizade pessoal e de toda sua família, que em vários momentos me proporcionaram grandes alegrias e me fizeram sentir em “casa”.

À diferentes pessoas que conheci no Departamento de Biologia Animal, ente outros no IB, UNICAMP e fora da universidade, que ao decorrer desta jornada foram importantes para a minha formação: a especial Melissa L. Moura, pela ajuda, carinho e alegria, que além de fisioterapeuta se tornou uma ótima parceira de campo; Gilberto J. Costa; João Francisco dos

Santos; Sebastian Sendoya; Lucas Kaminski; Janaína Cortinoz e Orestes Rebuá; Cristiano Agra e Ana Kristina Silva; Micael Nagai; Elen Peres e Vini.

Ao FutArenaBio, atividade esportiva semanal que me possibilitou diversos momentos de descontração e o aparecimento de grandes amizades com vários “jogadores”, como Lucas Kaminski, Sebastian Sendoya, Ricardo Gabriel, Henrique Silveira, André Gil, Rafael Carioca, Ricardo Saci, Tiago Torto, Luizinho, Lobato, João Itinerante, Cris Luvinha, Jessie, Márcio Uehara, Tiago Toyoyo, Tiago Bernabé, , Alexandre, Pablo, Márcio Romero, Javier, entre outros goleadores, de diferentes áreas de pesquisa, dentro e fora da universidade.

A todos os amigos da Moradia Estudantil da Unicamp, em especial a Mariana Arruda, José Maria, Amarildo, Luís Cláudio, Marcelo Kunita, Alessandra, pela convivência harmoniosa e divertida e pela integração de diferentes pensamentos de outras áreas da ciência.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, William Zambuzi, Daisy e Denise Machado, Gustavo, Tiago Martinelli, Alex Rafacho, e principalmente Rodrigo A. da Silva, pela amizade, apoio e discussões construtivas no decorrer do doutorado.

## RESUMO

Alcaloides pirrolizidínicos (APs) representam uma classe de compostos secundários de plantas expressos constitutivamente que são tóxicos e/ou deterrentes para diversos insetos e vertebrados. Assume-se que APs evoluíram como um sistema químico de defesa de plantas sob pressão seletiva de insetos herbívoros de diferentes grupos taxonômicos que evoluíram adaptações para detoxificar esses compostos, permitindo a exploração de fontes de alcaloides e sua utilização na defesa contra predadores, comunicação química e reprodução. Neste trabalho investigamos os aspectos bioquímicos da aquisição de diferentes classes estruturais de APs em Arctíneos Neotropicais especialistas, associados ao custo em termos de desempenho no sequestro destes compostos e sua utilização na comunicação sexual, bem como estes alcaloides atuam na defesa química. Nós integramos uma análise química detalhada da concentração e composição de APs em insetos e plantas, medidas de desempenho em larvas e adultos, bioensaios de predação com predadores vertebrados e invertebrados e ferramentas moleculares para investigar como APs estão mediando estas interações ecológicas. Primeiramente, nós estudamos o sistema de interação entre *Utetheisa ornatrix* e diferentes plantas hospedeiras do gênero *Crotalaria* (Fabaceae). Nós mostramos a importância da filogenia da planta hospedeira na defesa química em adultos da mariposa. Verificamos que as diferenças na defesa química em adultos da mariposa pode ser explicada por dois clados em *Crotalaria*, um com elevada e outro com baixa concentração de APs nas folhas. As diferentes estruturas de APs metabolizadas por *U. ornatrix*, incluindo alcaloides característicos de insetos, “insect PAs”, são responsáveis pela defesa química em adultos de um modo dose-dependente. No capítulo dois, incorporamos em dieta artificial diferentes estruturas de APs em diferentes concentrações e em concentrações molares equivalentes para larvas de *U. ornatrix*. Nós mostramos que o tipo e a concentração de alcaloide na dieta afeta

o sequestro desses compostos por *U. ornatrix* e que os APs incorporados são metabolizados diferencialmente, transformados bioquimicamente e parte é utilizado na biossíntese do feromônio sexual de machos hidroxidanaidal. Diferentes concentrações de um mesmo alcaloide não afetaram o desempenho de larvas e adultos, mas APs com diferentes estruturas em concentrações equimolares afetaram a eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatrix*. Observamos que a defesa química na mariposa é influenciada pelo tipo estrutural e concentração de AP na dieta, bem como a espécie de predador. Nós mostramos que “insect PAs” são importantes na defesa química. Finalmente, nós estudamos a interação entre *Scearctia figulina* e a planta hospedeira *Heliotropium transalpinum* (Boraginaceae). Nós mostramos que *S. figulina* possui uma elevada plasticidade metabólica e bioquímica em sequestrar e processar os APs da planta. Os APs são sequestrados pela larva e metabolizados por dois mecanismos principais: (1) inversão estereoquímica de ésteres de heliotridina com configuração (7*S*) e/ou (3'*R*) para uma configuração (7*R*) e/ou (3'*S*), e (2) hidrólise da ligação éster do AP da planta e formação de “insect PAs”. Estes alcaloides protegem larvas e adultos de *S. figulina* contra diferentes predadores. Nós discutimos como a importância funcional desses resultados podem influenciar as relações ecológicas estudadas.

**Palavras-chave:** interação inseto-planta, defesas de plantas, *Utetheisa ornatrix*, *Scearctia figulina*, *Crotalaria*.

## ABSTRACT

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) represent a class of plant secondary compounds constitutively expressed which are toxic and/or deterrents to various insects and vertebrates. It is assumed that PAs have evolved as a plant chemical defense system under selective pressure of herbivorous insects from different taxonomic groups that evolved adaptations to detoxify these compounds, allowing the exploitation of alkaloids sources and their use in defense against predators, chemical communication and reproduction. In this work we investigate the biochemical aspects of the acquisition of different structural classes of PAs in Neotropical specialist Arctiinae, associated with fitness cost in sequestering these compounds and their use in sexual communication, as well these alkaloids act on moth's chemical defense. We integrate a detailed chemical analysis of the PA concentration and composition on insects and plants, fitness measures in larvae and adults, predation bioassays with vertebrate and invertebrate predators and molecular techniques to investigate how PAs are mediating these ecological interactions. First, we study the interaction between *Utetheisa ornatrix* and different host plants of the genus *Crotalaria* (Fabaceae). We show the importance of host plant phylogeny on the chemical defense of the adult moths. We found that the differences in chemical defense can be explained by two clades in *Crotalaria*, one with high and the other with low PA content in the leaves. The different PAs structures metabolized by *U. ornatrix*, including characteristic insect alkaloids, "insect APs", are responsible for the moth's chemical defenses in a dosage- response way. Second, we incorporated different PAs structures into artificial diet at different concentrations and at equivalent molar concentrations for larvae of *U. ornatrix*. We show that the type and the concentration of alkaloid in the diet affects the PA acquisition by *U. ornatrix* and that the sequestered PAs are metabolized differentially, biochemically processed, and part is used in

the biosynthesis of males sex pheromone hidroxidanaidal. We found that different concentrations of the same alkaloid do not affect the fitness of larvae and adults, but different PAs at equimolar concentrations affect the metabolic and digestive efficiency of *U. ornatix*. We note that the moth's chemical defense is influenced by PA type and concentration in the diet as well as the kind of predator. We show that "insect PAs" are important in chemical defense. Finally, we study the interaction between *Scearctia figulina* and the host plant *Heliotropium transalpinum* (Boraginaceae). We found that *S. figulina* has a high biochemical and metabolic plasticity in sequester and process the plant PAs. The PAs are sequestered by the larva and metabolized by two principal mechanisms: (1) stereochemical inversion of heliotridine esters with (7S) and / or (3'R) configuration to a configuration (7R) and / or (3'S) and (2) hydrolysis of the ester linkage of plant PAs and formation of "insect PAs". These alkaloids protect larvae and adults of *S. figulina* against different predators. We discuss how the functional importance of these results can influence the ecological relationships studied.

Keywords: plant-insect interactions, plant defenses, *Utetheisa ornatix*, *Scearctia figulina*, *Crotalaria*.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figure 1. Female of *Nephila clavipes* handling an adult male of *Utetheisa ornatrix*. Note that the spider touches the moth with her pedipalps, probably evaluating the content of defensive pyrrolizidine alkaloids ..... 87
- Figure 2. Some pyrrolizidine alkaloids found in this study. The alkaloids are drawn in their *N*-oxide form. For more structures, see, e.g., Flores et al. [29]..... 88
- Figure 3. Percentage of adults of *Utetheisa ornatrix* released by *Nephila clavipes* with respect to eight host-plant species and plant parts (leaf or unripe seed) fed to the larvae. The natives *Crotalaria micans*, *C. paulina*, and *C. vitellina*, non-natives *C. juncea*, *C. ochroleuca*, and *C. spectabilis*, and species of uncertain origin *C. incana* and *C. pallida*. Numbers in parentheses in "part of plants" represent the number of adults bioassayed for each diet ..... 89
- Figure 4. Concentration of pyrrolizidine alkaloids (mean  $\pm$  se) in adults of *Utetheisa ornatrix* with respect to eight host-plant species and plant parts (leaves or unripe seeds) fed to the larvae. Numbers in parentheses in "part of plants" represent the number of adults analyzed for each diet. The dotted line is the concentration at which baits treated with monocrotaline and integerrimine in the *N*-oxide form (3.0  $\mu$ g/mg) were 100% released by *Nephila clavipes*. The probability that the PA concentration in adults fed as larvae on leaves or seeds, for each host plant, is significantly different is given above the bars (*post hoc* Tukey test). For other statistics, see Results ..... 90

Figure 5. Concentration of pyrrolizidine alkaloids (mean  $\pm$  se) in leaves and unripe seeds of *Crotalaria* species, which were used to rear *Utetheisa ornatrix* larvae. The concentration is given in ln transformed data ( $\mu\text{g/g}$  dry weight). The numbers inside the bars represent the mean  $\pm$  SE of untransformed data in  $\mu\text{g/mg}$  dry weight. The probability that the PA concentration in leaves and seeds, for each host plant, is significantly different is given above the bars (*post hoc* Tukey test)..... 91

Figure 6. Non-linear relationship between the mean of pyrrolizidine alkaloid concentration ( $\mu\text{g/mg}$  dry weight) in *Crotalaria* species and in adults of *Utetheisa ornatrix*. Red symbols are leaves and blue are seeds. The dotted line is the concentration at which baits treated with monocrotaline and integerrimine in the *N*-oxide form ( $3.0 \mu\text{g/mg}$ ) were 100% released by *Nephila clavipes* ..... 92

Figure 7. Non-linear relationship between the mean of pyrrolizidine alkaloid concentration ( $\mu\text{g/mg}$  dry weight) in adults of *Utetheisa ornatrix* fed on leaves of different *Crotalaria* species and the percentage of these adults released by *Nephila clavipes*. Red symbols stand for larvae fed on leaves and blue symbols stand for larvae fed on are seeds. The dotted line is the concentration at which baits treated with monocrotaline and integerrimine in the *N*-oxide form ( $3.0 \mu\text{g/mg}$ ) were 100% released by *Nephila clavipes* ..... 93

Figure 8. Percentage of baits treated with different PA *N*-oxides, which were released by the spider *Nephila clavipes*. In black, the concentration of PAs was  $3.0 \mu\text{g/mg}$  and in white  $0.3 \mu\text{g/mg}$ ..... 94

Figure 9. Bayesian inference topology for eight species of *Crotalaria* based on ITS sequences onto which are mapped the amount and type of PAs in leaves of the *Crotalaria* host plants (above) and in adults of *Utetheisa ornatrix* whose larvae feed on these plants (below). Response of the spider *Nephila clavipes* in relation to adults of *Utetheisa ornatrix* is given by the side of each *Crotalaria* species. Numbers in each node indicate Bayesian posterior probabilities. The scale below the tree indicates the mean number of substitutions per site... 95

## CAPÍTULO 2

Figura 1. Alcaloides pirrolizidínicos e seus derivados ..... 184

Figura 2. Estágios de desenvolvimento de *Utetheisa ornatrix*. (A) Ovos, (B) larva de 5º instar se alimentado em folhas de *Crotalaria ochroleuca*, (C) macho - visão dorsal, (D) macho - visão ventral, (E) fêmea - visão dorsal, (F) fêmea - visão ventral, e (G) fêmea ovipondo em flor de *Crotalaria ochroleuca* ..... 185

Figura 3. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de massa seca) nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Utetheisa ornatrix* que enquanto larva se alimentou em dieta artificial contendo diferentes alcaloides (A. monocrotalina, B. retronecina, C. platinecina), em diferentes concentrações (branco =  $4,8 \times 10^{-3}\%$ , listrado =  $2,4 \times 10^{-2}\%$  e preto =  $1,2 \times 10^{-1}\%$ ).. 188

Figura 4. Metabolismo e transformações bioquímicas de diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos incorporados em dieta e sequestrados por *Utetheisa ornatrix* em diferentes fases de desenvolvimento. A- Sequestro da monocrotalina e biossíntese do

hidroxidanaidal. B- Sequestro, modificação bioquímica e transesterificação inseto-específica das bases necinas platinecina e retronecina em insect PAs e biossíntese do hidroxidanaidal.

..... 189

Figura 5. Análise dos componentes principais da abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos em diferentes estágios de desenvolvimento (larva, pupa, machos e fêmeas) de *Utetheisa ornatrix*, cujas larvas foram alimentadas em dietas com três alcaloides diferentes [monocrotalina (círculo preto), retronecina (círculo branco) e platinecina (quadrado branco)]. O eixo 1 explica 70,94% da variância total e o eixo 2 explica 24,67%. Os vetores originados no centro da figura representam os alcaloides fortemente relacionados com o padrão de componentes principais ..... 191

Figura 6. Percentagem de larvas de *Utetheisa ornatrix* predadas pela aranha *Lycosa erythrognatha* (A) e pintinhos *Gallus gallus* (B). As larvas se alimentaram em dieta artificial contendo diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos (APs) em diferentes concentrações [monocrotalina (preto), retronecina (branco), platinecina (listrado)] ..... 192

Figura 7. Percentagem de adultos de *Utetheisa ornatrix* predados pelas aranhas *Nephila clavipes* (A), *Lycosa erythrognatha* (B) e pintinhos *Gallus gallus* (C). Os adultos são originados de larvas que se alimentaram em dieta com diferentes concentrações de diferentes alcaloides pirrolizidínicos [monocrotalina (preto), retronecina (branco), platinecina (listrado)]. Machos e fêmeas foram agrupados, desde que sexo não apresentou diferenças significativas nas análises estatísticas (veja Tabela 10)..... 193

Figura 8. Número de larvas palatáveis de *Tenebrio molitor* tratadas com 0,3 µg/mg (branco) e 3,0 µg/mg (preto) de diferentes alcaloides pirrolizidínicos *N*-óxidos, que foram predadas pela aranha *Nephila clavipes*..... 195

### CAPÍTULO 3

Figura 1. Alcaloides pirrolizidínicos encontrados em *Heliotropium transalpinum* e *Scearctia figulina* ..... 237

Figura 2. A planta hospedeira, *Heliotropium transalpinum* (A), ovos (B), larvas de 2º instar (C) e adultos (D) da mariposa *Scearctia figulina* ..... 239

Figura 3. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos por *Seiarctia figulina* nos diferentes estágios de desenvolvimento alimentada em folhas de *Heliotropium transalpinum*. Os valores estão representados pela média ± erro padrão ..... 240

Figura 4. Análise dos componentes principais da abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos em diferentes estágios de desenvolvimento (ovo, larva, pupa, machos e fêmeas) de *Scearctia fugilina*, cujas larvas foram alimentadas em folhas de *Heliotropium transalpinum*. O eixo 1 explica 74,45% da variância total e o eixo 2 explica 24,40%. Os vetores originados no centro da figura representam os alcaloides (descritos pelo índice de retenção) fortemente relacionados com o padrão de componentes principais. Ver os índices de retenção dos alcaloides nas Tabelas 1 e 2..... 241

Figura 5. Metabolismo e principais modificações bioquímicas dos alcaloides pirrolizidínicos presentes na planta hospedeira *Heliotropium transalpinum* e sequestrados por *Seiarctia figulina* nas diferentes fases de desenvolvimento: A- Inversão estereoquímica dos centros assimétricos 7S-OH e 3S-OH; B- Sequestro e biossíntese de Insect PAs por meio da transesterificação inseto-específica dos APs da planta com um ácido néxico do próprio inseto. .... 242

Figura 6. Defesa química de diferentes estágios de desenvolvimento de *Scearctia figulina* contra diferentes predadores (aves *Gallus gallus* e as aranhas *Lycosa erythrognatha* e *Nephila clavipes*)..... 244

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Table 1. Species of *Crotalaria* used to feed larvae of *Utetheisa ornatrix* to obtain adults for *Nephila clavipes* bioassay and PA analysis..... 77
- Table 2. Mass fragmentation pattern of pyrrolizidine alkaloids found in *Crotalaria* species and in adults of *Utetheisa ornatrix* fed on these host plants. The analyses were carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in electron impact mode and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in electrospray ionization mode..... 78
- Table 3. Relative abundance (%) of pyrrolizidine alkaloids in adults of *Utetheisa ornatrix* (male: M, female: F) and the species of *Crotalaria* used as larval host plants (HP). Five individuals were used for GC-MS analysis. Only seeds and individuals from seeds were analyzed. The data are shown as mean  $\pm$  standard error ..... 83
- Table 4. Logistic regression results for the *Nephila clavipes* response (predation or release) in relation to the concentration of pyrrolizidine alkaloids in adults of *Utetheisa ornatrix* fed as larvae on leaves or unripe seeds of eight host plants..... 86

## CAPÍTULO 2

Tabela 1. Resultado da ANOVA de 3 fatores para comparar as concentrações de alcaloides pirrolizidínicos sequestrados por *Utetheisa ornatrix* em relação às diferentes estruturas de APs em diferentes concentrações nos diferentes estágios de desenvolvimento..... 168

Tabela 2. Abundância relativa (%) dos alcaloides pirrolizidínicos sequestrados e transformados bioquimicamente por *Utetheisa ornatrix* que enquanto larva se alimentou em dieta contendo 0,12% de diferentes estruturas de alcaloides pirrolizidínicos nas diferentes fases de desenvolvimento, após extração, identificação e caracterização por CG-MS ..... 169

Tabela 3. Padrão de fragmentação (EM-IE) e Índice de retenção (IR) dos Alcaloides pirrolizidínicos meabolizados e transformados bioquimicamente por *Utetheisa ornatrix* em relação às diferentes estruturas de APs em diferentes concentrações nos diferentes estágios de desenvolvimento ..... 171

Tabela 4. Efeito nas medidas de desempenho em *Utetheisa ornatrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial contendo monocrotalina (A), retronecina (B) e platinecina (C), em diferentes concentrações, desde a eclosão até a pupação. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão seguidos do tamanho amostral entre parêntesis..... 173

Tabela 5. Desempenho de adultos de *Utetheisa ornatrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial monocrotalina (A), retronecina (B) e platinecina (C), em diferentes concentrações, desde a eclosão até a pupação. Após a emergência os adultos foram divididos em 3 tratamentos no qual um macho e uma fêmea foram pareados (n=16). Os valores estão

representados pela média  $\pm$  erro padrão ..... 176

Tabela 6. Efeito nas medidas de desempenho em *Utetheisa oratrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos em concentrações molares equivalentes desde a eclosão até a pupação. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão seguidos do tamanho amostral entre parêntesis..... 178

Tabela 7. Desempenho de adultos de *Utetheisa oratrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos em concentrações molares equivalentes desde a eclosão até a pupação. Após a emergência os adultos foram divididos em 4 tratamentos no qual um macho e uma fêmea foram pareados (n=16). Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão ..... 179

Tabela 8. Efeito nos parâmetros fisiológicos e nutricionais do consumo e utilização de alimento por larvas de *Utetheisa oratrix* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos em concentrações molares equivalentes desde a eclosão até a pupação. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão seguidos do tamanho amostral entre parêntesis ..... 180

Tabela 9. Resultado do teste de qui-quadrado para associação parcial entre os vários efeitos que podem explicar a resposta de predadores em relação a larvas de *Utetheisa oratrix* que se alimentaram em dieta com diferentes concentrações de diferentes alcaloides pirrolizidínicos ..... 181

Tabela 10. Resultado do teste de qui-quadrado para associação parcial entre os vários efeitos que podem explicar a resposta de predadores em relação a machos e fêmeas adultos de

<i>Utetheisa ornatrix</i> , cujas larvas se alimentaram em dieta artificial contendo diferentes estruturas de alcaloides pirrolizidínicos (APs) em diferentes concentrações.....	182
--	-----

### CAPÍTULO 3

Tabela 1. Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos (média $\pm$ erro padrão) nos diferentes estágios de desenvolvimento de <i>Scearctia figulina</i> e na planta hospedeira <i>Heliotropium transalpinum</i> .....	231
--	-----

Tabela 2. Padrão de fragmentação de massas, em impacto de elétrons, dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento de <i>Scearctia figulina</i> e na planta hospedeira <i>Heliotropium transalpinum</i> .....	234
---	-----

## SUMÁRIO

Introdução.....	25
Referências .....	39
Capítulo 1- Does feeding on different host plants alter the chemical defense effectiveness of a specialist herbivore? .....	45
Abstract.....	46
Introduction .....	47
Materials and Methods .....	51
Results .....	59
Discussion.....	63
References .....	69
Tables .....	77
Figures .....	87
Capítulo 2 - Como diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos afetam o desempenho e a defesa química de larvas e adultos da mariposa Neotropical especialista <i>Utetheisa ornatrix</i> (Arctiinae: Erebidae)? .....	97
Resumo .....	97
Introdução.....	99
Material e Métodos.....	105
Resultados.....	127
Discussão .....	131
Conclusão geral .....	153

Referências .....	156
Tabelas.....	168
Figuras .....	186

Capítulo 3 - Alcaloides pirrolizidínicos na mariposa <i>Scearctia figulina</i> (Erebidae: Arctiinae: Pericopina): metabolismo e defesa química contra diferentes predadores.....	197
Resumo .....	197
Introdução.....	199
Material e Métodos.....	203
Resultados.....	211
Discussão .....	215
Referências .....	222
Tabelas.....	231
Figuras .....	237
Conclusões gerais .....	245
Anexos.....	247

## INTRODUÇÃO

Plantas e insetos têm evoluído juntos por cerca de 350 milhões de anos, desenvolvendo diferentes níveis de interação (Gatehouse 2002). Em termos de diversidade taxonômica e importância ecológica, os insetos são o grupo de indivíduos dominantes e as plantas representam a maior parte da biomassa da terra (Schoonhoven 2005). As interações entre plantas e insetos compreendem um importante fluxo de matéria e energia do maior grupo de seres autotróficos para o maior grupo de seres heterotróficos (van Joop 2005). Embora algumas dessas interações como a polinização, possam ser mutualmente benéficas, a maioria destas relações envolve a herbivoria ou predação da planta pelo inseto e defesas da planta contra insetos herbívoros. Essa longa exposição aos insetos têm sido uma das principais causas do desenvolvimento da grande diversidade de plantas. Os insetos, com uma grande variedade de forma e história de vida têm sido uma importante força seletiva na formação do reino vegetal. Esse papel foi postulado no artigo clássico de Ehrlich & Raven (1964) que atribui às interações entre insetos e plantas a geração da grande diversidade de toda forma de vida terrestre atual; o processo que geraria essa alta diversidade seria as pressões seletivas recíprocas que cada grupo exerceria no outro.

Plantas e insetos herbívoros são submetidos ao longo dos seus ciclos de vida à diversas pressões seletivas por parte de inimigos naturais. Plantas se defendem de insetos herbívoros e os insetos respondem a essas defesas. É um ciclo constante de ataques, defesas, superação de defesas e novos ataques. Nesse sentido, as plantas desenvolveram diferentes estratégias para se proteger do ataque de inimigos naturais, que envolvem defesas físicas como a proteção mecânica por espinhos e tricomas não glandulares, cristais de oxalato de cálcio e defesas químicas como compostos tóxicos ou deterrentes (Karban & Baldwin 1997). Esses compostos químicos são denominados de metabólitos secundários de plantas uma vez

que são biossintetizados pelo metabolismo secundário das mesmas a partir de rotas metabólicas complexas e interligadas, geralmente espécie-específicas e estão distribuídos diferencialmente em diversos grupos taxonômicos e possuem uma atividade biológica distinta sobre insetos herbívoros (Harbone 1993). Os mecanismos de toxicidade de compostos químicos defensivos de plantas incluem o rompimento de membranas dos insetos, inibição do transporte ou da transdução de sinais, inibição metabólica e interferência no controle hormonal durante o processo de desenvolvimento (Harborne 1993). As defesas químicas de plantas atuam diretamente sobre o herbívoro em um contexto bitrófico, ou indiretamente, pela atração de inimigos naturais dos herbívoros por sinais químicos emitidos pela planta, em um contexto multitrófico (Karban & Baldwin 1997). Estas defesas podem ser constitutivas, quando estão sempre presentes na planta independente do ataque de herbívoros ou outro tipo de estresse (revisão em Wittstock & Gershenzon 2002), ou podem ser induzidas, quando a biossíntese de compostos defensivos ocorre somente após a planta sofrer o ataque de insetos herbívoros ou outro tipo de stress (revisão em Karban & Baldwin 1997). Acredita-se que o genoma de plantas possua cerca de 20-60 mil genes, e que aproximadamente 15-25% destes genes codificam enzimas do metabolismo secundário (Somerville & Somerville 1999), que têm a capacidade de produzir mais de 100 mil compostos orgânicos defensivos diferentes (Wink 2003). Estas substâncias incluem os terpenos, compostos fenólicos, alcaloides, glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos, ácidos aristolóquico, entre outros (revisão em Wittstock & Gershenzon 2002).

No entanto, os insetos herbívoros necessitam de suas plantas hospedeiras para atender os requisitos necessários para o metabolismo e crescimento adequado. Muitos dos aspectos de vida de um inseto, tais como comportamento, fisiologia, bioquímica e ecologia, estão relacionados de algum modo com o alimento que consomem (Schoonhoven et al. 2005). A quantidade, a qualidade e a proporção de nutrientes presentes na planta, assim como a

presença de compostos secundários podem afetar de diferentes modos a biologia de um inseto herbívoro e a interação com predadores (Schoonhoven et al. 2005). Desse modo, insetos herbívoros generalistas e especialistas evoluíram uma série de mecanismos adaptativos como resposta as defesas químicas das plantas que consomem (Optiz & Müller 2009, Trigo 2011). Esses mecanismos incluem (1) escapar de compostos tóxicos no espaço e no tempo, evitando a alimentação em partes da planta com maior concentração de uma substância defensiva, (2) desativar exogenamente os compostos químicos, por meio da diminuição do fluxo dessas substâncias nas partes da planta onde o inseto se alimentará; isso ocorre, por exemplo, em plantas que produzem e liberam secreções em canais laticíferos, (3) detoxificar, por meio de enzimas, compostos menos hidrofílicos em mais hidrofílicos, facilitando sua excreção; isso envolve principalmente enzimas da fase-I do metabolismo xenobiótico, como as monooxigenases microssomais do citocromo P450 (Hartmann 2009), e (4) sequestrar os compostos químicos e utilizá-los em benefício próprio, como por exemplo, na proteção contra predadores e comunicação sexual; isto envolve a aquisição da substância, armazenamento, algumas vezes modificações, distribuição e concentração em tecidos especializados do inseto (Nishida 2002).

Optiz & Müller (2009) verificaram que mais de 250 espécies de insetos, abrangendo seis ordens distintas, sequestram compostos secundários de pelo menos 40 famílias de plantas. Os compostos sequestrados incluem uma grande diversidade de classes estruturais como glicosinolatos, compostos aromáticos, cianoglicosídeos, alcaloides pirrolizidínicos, cardenolidas, entre outros. O sequestro dessas substâncias pode ter evoluído independentemente em diferentes táxons de insetos herbívoros, e esse processo é predominante em coleópteros e lepidópteros, mas ocorre com frequência em insetos das ordens Heteroptera, Hymenoptera e Orthoptera (Optiz & Müller 2009). A maioria dos insetos herbívoros que sequestram compostos tóxicos de sua planta hospedeira, tornando-se

impalatáveis para predadores, são aposemáticos, apresentando uma coloração conspícua que alerta ao predador o seu sabor desagradável (Ruxton et al. 2004). Estes compostos apresentam atividade contra diferentes predadores, desde invertebrados como formigas e aranhas até vertebrados como répteis, aves e mamíferos (Trigo 2011, Nishida 2002).

Dentro deste cenário, a utilização de alcaloides pirrolizidínicos (APs) de plantas por um grande número de insetos especialistas de diferentes grupos taxonômicos representa um dos modelos biológicos mais estudados de interação inseto-planta mediados por compostos secundários de plantas. Estes compostos desempenham um papel central em interações multitróficas entre plantas, herbívoros e seus inimigos naturais (Nishida 2002, Optiz & Müller 2009, Macel 2011, Trigo 2011). Estes alcaloides compreendem um sistema químico de defesa de plantas expressos constitutivamente por diversos grupos taxonômicos de plantas das famílias Asteraceae (tribos Senecioneae e Eupatorieae), Boraginaceae, Fabaceae (tribo Crotalarieae), Orchidaceae e Apocynaceae (tribo Echiteae), além de poucas espécies de Convolvulaceae, Ranunculaceae, Celastraceae, Santalaceae e Rhizophoraceae (Hartmann 2009). Do ponto de vista estrutural, APs são ésteres de uma base necina (=anel pirrolizidínico) com diferentes ácidos nécicos totalizando cerca de 360 estruturas, podendo ocorrer na forma de base livre e *N*-óxido (Hartmann & Witte 1995). Estes alcaloides são classificados em diferentes classes estruturais relacionados à sua ocorrência taxonômica (Hartmann & Witte 1995). Os mais abundantes são do tipo senecionina e licopsamina. Os primeiros representam alcaloides macrocíclicos de 12 membros (como a senecionina) e em menor proporção diésteres de cadeia aberta (como a triangularina), e são característicos da família Asteraceae, tribo Senecioneae e de espécies de *Crotalaria* (Fabaceae: Crotalarieae). Os alcaloides do tipo licopsamina são monoésteres ou diésteres de cadeia aberta com um ácido quase que exclusivo de APs na natureza, o ácido 2-isopropil-2,3-diidroxitútrico, e são encontrados em Asteraceae (tribo Eupatorieae), Boraginaceae e Apocynaceae

(ocasionalmente presente como triésteres, como a parsonsina). Os alcaloides do tipo monocrotalina são macrocíclicos de 11 membros e estão presentes na tribo Crotalariaeae. Os APs com a dupla ligação na posição 1,2 (alcaloides 1,2-desidropirrolizidínicos) e com pelo menos um grupo hidroxila esterificado apresentam atividade hepatotóxica, pneumotóxica e carcinogênica em vertebrados (Mattocks 1986, Stegelmeier et al. 1999), genotóxica em insetos (Frei et al. 1992) e deterrente contra herbívoros vertebrados e invertebrados (Macel 2011, Trigo 2011).

Assume-se que APs evoluíram como um sistema químico de defesa sob pressão seletiva de insetos herbívoros de diferentes grupos taxonômicos, que desenvolveram adaptações não só para detoxificá-los, mas também para permitir a exploração de fontes de APs e sua utilização na defesa contra predadores, comunicação química e reprodução (Optiz & Müller 2009, Macel 2011, Trigo 2011). Em lepidópteros, este fenômeno está associado à clados distintos como as borboletas Danaini e Ithomiini (Nymphalidae: Danainae) e mariposas Arctiinae (Erebidae) (Trigo et al. 1996, Conner & Weller 2004, Trigo 2008, 2011). Outros exemplos ocorrem em algumas espécies de besouros da família Chrysomelidae (Pasteels & Hartmann 2004), o gafanhoto *Zonocerus variegatus* (Biller et al. 1994), o pulgão *Aphis jacobaeae* (Witte et al. 1990) e o hemíptero *Largus rufipennis* (Klitzke & Trigo 2000).

As mariposas Arctiinae representam um dos melhores exemplos de estudo da utilização de APs de plantas por insetos herbívoros especializados. O impacto do sequestro de APs de plantas na biologia dessas mariposas e a interação com outros níveis tróficos, os mecanismos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos desenvolvidos por estes para adotarem esse sistema químico de defesa são extremamente sofisticados. Durante a adaptação de arctíneos aos APs, quatro requisições mecânicas basais foram desenvolvidas: (1) reconhecimento específico de uma fonte de AP, (2) habilidade de explorar essa fonte eficientemente, (3) manutenção e armazenamento destes em um estado desativado

(=detoxificado) e (4) transferência estável de APs entre os estágios de vida do inseto e um metabolismo eficiente que permite a transformação e convergência dos APs sequestrados para tecidos estratégicos e locais de proteção (revisão em Hartmann 2009).

Para atender a estes requerimentos, os mecanismos adaptativos desenvolvidos ao longo da história evolutiva desses insetos consistiram no desenvolvimento de (1) quimiorreceptores bucais e neurônios que respondem sensível e especificamente a APs, elicitando e estimulando a alimentação em APs (Bernays et al. 2003), e (2) detoxificação metabólica de APs por uma enzima monooxigenase flavina dependente, a “pyrrolizidine-alkaloid-*N*-oxygenase (PNO)” altamente específica para APs (Lindigkeit et al. 1997, Naumann et al. 2002). Larvas da mariposa especialista *Tyria jacobaeae* (Arctiinae) sequestram APs da planta hospedeira e estes são absorvidos como base livre no intestino e então *N*-oxidados na hemolinfa pela PNO. Naumann et al. (2002) mostraram que o gene da PNO em *T. jacobaeae* foi recrutado de uma família de genes monooxigenase flavina dependente inseto-específica de função desconhecida. Esta enzima posteriormente foi encontrada em outros arctíneos adaptados a APs. Sehlmeier et al. (2010) mostraram que em Lepidoptera ocorrem três famílias de genes monooxigenase flavina dependentes, e que a PNO se originou de uma duplicação gênica mais basal na linhagem de arctíneos, permitindo a exploração e o acúmulo desses compostos em uma forma metabolicamente estável por esses insetos.

A transferência estável de APs durante o ciclo de vida do inseto e um metabolismo eficiente que permite a transformação e convergência dos APs sequestrados para tecidos estratégicos e locais de proteção revelam uma alta plasticidade metabólica e bioquímica adquirida por mariposas Arctiinae. Os APs podem ser processados diferentemente em insetos especialistas: (1) APs são sequestrados pela larva e transmitidos à fase adulta sem alterações, (2) APs com a base necina otonecina, que não podem ser desativados por *N*-oxidação, são excretados nas fezes, e (3) APs são modificados metabolicamente após o sequestro (Hartmann

et al. 2004). Nesse último caso, APs são sequestrados pela larva, mas antes de serem transferidos a pupa sofrem um processo de transesterificação inseto-específica, que leva a formação de ‘insect PAs’, alcaloides característicos de insetos, que são ésteres da base necina da planta esterificado com um ácido néxico originário do próprio inseto (Hartmann et al. 1990). A grande especificidade pelo substrato dessa enzima esterificante é responsável por manter uma rota de recuperação, permitindo a insetos adaptados a APs sequestrar qualquer tipo de base necina da planta aumentando seu arsenal de defesa. Em arctíneos que sintetizam e emitem o feromônio sexual hidroxidanaidal, grande parte dos APs sequestrados dão origem ao feromônio via creatonotinas (um “insect PA”) como intermediário comum (Hartmann et al. 2003, 2004).

Além da habilidade de sintetizar “insect PAs”, arctíneos, assim como danaíneos e ithomíneos também são capazes de modificar os APs bioquimicamente. Dentre as mais importantes modificações destacam-se a conversão de APs (tipo licopsamina) com configuração 7*S*-OH para APs 7*R*-OH (Schulz et al. 1993, Trigo et al. 1994). Adicionalmente a inversão no centro C7, a epimerização no centro C3’ tem sido ocasionalmente observada (Trigo et al. 1994, Hartmann et al. 2005a,b). Os arctíneos também são capazes de aromatizar APs 1,2 saturados (como sarracina) e utilizá-los como precursor de feromônios (Hartmann et al. 2005a,b).

Embora os mecanismos citados acima auxiliem a entender as sofisticadas adaptações fisiológicas e bioquímicas do processo de integração de APs na biologia de mariposas Arctiinae, várias questões de interesse ainda necessitam de esclarecimento. Sob uma perspectiva ecológica e evolutiva pouco se sabe como diferentes estruturas de APs são sequestradas e metabolizadas por especialistas, quais os custos associados com a utilização destes e o impacto ecológico nas interações em outros níveis tróficos. Esses insetos são afetados negativamente pela aquisição de diferentes estruturas de APs? Esses efeitos

negativos são discerníveis e quantificáveis? Qual o papel ecológico dessas substâncias na defesa contra predadores? Qual a importância destes APs e seus metabólitos na comunicação química entre as mariposas?

Enquanto evidências apontam que herbívoros especialistas são menos afetados pelo sequestro de compostos secundários de plantas do que generalistas (Van Der Meijden 1996), os primeiros também podem ser afetados negativamente por estas substâncias (Fordyce & Nice 2008). De fato, o balanço entre os custos e benefícios da utilização de plantas contendo APs como recurso alimentar por diferentes insetos herbívoros especialistas e generalistas que por sua vez apresentam níveis de interação variáveis com suas plantas hospedeiras e diferentes mecanismos para lidarem com estes compostos têm contribuído para a evolução, manutenção da concentração e da diversidade de compostos secundários em plantas como os APs (Deprés et al. 2007, Van Der Meijden 1996, Joshi & Vrieling 2005).

Adicionalmente, para ampliarmos nosso conhecimento sobre os aspectos coevolutivos das interações entre insetos e plantas, devemos incluir o entendimento de como ambas as interações inseto-planta afetam e são afetadas por suas relações com o terceiro nível trófico destes herbívoros, ou seja, inimigos naturais como: predadores, parasitoides e/ou parasitas (Price et al. 1980). Embora vários herbívoros possuam a capacidade de explorar compostos químicos defensivos de plantas em seu próprio benefício (Nishida 2002), o sequestro e detoxificação destes compostos podem afetar os insetos e causar um custo energético nesse processo (Berenbaum & Zangerl 1993). Apesar de alguns exemplos onde o sequestro de compostos secundários de plantas por insetos herbívoros para defesa contra predadores tem mostrado serem livres de custos (Holloway et al. 1991, Holloway et al. 1993), demandas conflitantes entre o nível de defesa química em insetos e outras características de aptidão (sobrevivência, taxa de crescimento, peso e reprodução) têm sido descritos (Longson & Joss 2006).

Evidências experimentais do papel de APs na defesa química contra predadores têm como base as seguintes abordagens (revisão em Trigo 2011): (1) utilização de adultos selvagens de lepidópteros neotropicais com coloração conspícua (Danaini, Ithomiini Arctiinae) associada com observações em campo e experimentos em laboratório com diferentes predadores, (2) bioensaios de predação com APs isolados de plantas aplicados topicamente em organismos palatáveis que permite inferir experimentalmente sobre a atividade de APs contra predadores e (3) manipulação de APs em dieta artificial com um controle de palatabilidade (dieta sem AP) e o oferecimento destas para insetos herbívoros associado com bioensaios de predação posteriores.

Nesse contexto, o presente trabalho foi desenvolvido, procurando investigar a toxicidade de APs, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que permitem o sequestro destes por insetos adaptados e os custos no desempenho e aptidão associados a esse processo, bem como o seu papel ecológico na defesa contra predadores e na comunicação sexual. Nós utilizamos como modelo de estudo duas espécies de mariposas Arctiinae neotropicais especialistas em plantas que contêm APs. O primeiro modelo é representado por *Utetheisa ornatrix*, cuja larva se alimenta de folhas e sementes verdes de plantas do gênero *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalariaeae); que produzem predominantemente APs do tipo monocrotalina e senecionina (Eisner & Meinwald 2003; Cogni & Futuyama 2009, Flores et al. 2009; Cogni et al. 2011; Trigo 2011). Larvas de *U. ornatrix* sequestram esses alcaloides de suas plantas hospedeiras e os retém durante toda a metamorfose; machos transmitem esses APs para as fêmeas por ocasião da cópula, e esta passa os alcaloides para os ovos (Eisner & Meinwald 2003). Esses alcaloides defendem todos os estágios de desenvolvimento contra predadores (Trigo 2011). O processo de transmissão de APs do macho para a fêmea durante a cópula é intrincado. O macho adverte para a fêmea o conteúdo de AP em seus tecidos, via hidroxidanaidal, um feromônio derivado de AP. Este processo ocorre por meio da eversão da

coremata, uma estrutura androconial formada por escamas modificadas, durante a aproximação pré-copulatória (Eisner & Meinwald 2003). Fêmeas são capazes de discriminar machos com maior conteúdo de AP em função desse sinal feromonal emitido, que é um reflexo da quantidade de AP do macho (Bezzarides & Eisner 2002). A capacidade de transmissão de APs do macho para fêmea durante a cópula é uma característica herdável (Iyengar et al. 2002a). Por escolherem machos mais ricos em hidroxidanaidol as fêmeas garantem vantagem fenotípica (recebendo uma quantidade maior de AP como presente nupcial) e genotípica (capacidade maior de uma prole com sucesso reprodutivo) (Iyengar et al. 2002b). O segundo modelo biológico que utilizamos foi a mariposa *Sceiarctia figulina* (Erebidae: Arctiinae: Pericopina), que enquanto larva se alimenta de folhas de *Heliotropium transalpinum* (Boraginaceae), que produzem APs do tipo licopsamina (Trigo et al. 1993).

No primeiro capítulo, nós investigamos como diferentes plantas hospedeiras com diferentes estruturas e concentração de APs em seus tecidos oferecidas para larvas de *U. ornatrix*, afetam a defesa química de adultos da mariposa. Nós alimentamos um grande número de larvas em folhas e sementes de diferentes espécies de *Crotalaria* de ocorrência neotropical, desde nativas, invasoras e de origem incerta. Após esse procedimento, nós testamos os adultos emergidos contra *Nephila clavipes* (Nephilidae) para verificarmos se a proteção química pela aquisição de APs difere entre diferentes plantas hospedeiras. Como as larvas de *U. ornatrix* podem se alimentar de folhas e sementes de *Crotalaria*, nós testamos os adultos provenientes desta dieta para cada planta hospedeira. Nós analisamos a concentração e o perfil dos APs presentes tanto em adultos como nas plantas hospedeiras e correlacionamos a concentração de APs em adultos com o conteúdo de alcaloide da parte da planta da qual o mesmo se alimentou enquanto larva. Nós também fizemos uma correlação entre a concentração e o perfil dos APs sequestrados e metabolizados pela mariposa com a resposta da aranha no bioensaio de predação. Nós purificamos e isolamos alguns dos principais APs

metabolizados por *U. ornatix* e testamos contra a aranha. Por fim, para investigarmos o papel da filogenia da planta hospedeira na defesa química da mariposa, nós mapeamos o perfil e a concentração de APs nas espécies de *Crotalaria*, à concentração de AP em adultos de *Utetheisa* e a resposta defensiva de *N. clavipes* contra uma hipótese filogenética independente para as oito espécies de *Crotalaria* utilizada no trabalho.

Nós mostramos que o único fator que desempenha um papel importante na defesa de *U. ornatix* é a quantidade de AP sequestrado. Outros fatores como sexo, ou a alimentação enquanto larva em plantas diferentes não são determinantes. Nós também verificamos que os principais APs metabolizados por *U. ornatix* (tipo monocrotalina, senecionina e uma mistura putativa de insect PAs) protegem os adultos contra predação de modo similar. Por meio da nossa análise filogenética, podemos inferir que o sequestro de APs e a utilização na defesa contra predação em *U. ornatix* esta relacionada com a filogenia de *Crotalaria*. Nós discutimos esses resultados considerando a relação entre a história de vida das plantas hospedeiras com a defesa química de *U. ornatix*.

No segundo capítulo, nós investigamos a capacidade metabólica e bioquímica de *U. ornatix* em lidar com diferentes classes estruturais de APs e o impacto do sequestro dessas substâncias no desempenho de larvas e adultos, assim como o papel na defesa química contra predadores e na comunicação sexual dos adultos. Nós adotamos duas abordagens experimentais neste trabalho.

Na primeira, nós incorporamos os APs monocrotalina, retronecina e platinecina em uma dieta artificial em diferentes concentrações e medimos vários parâmetros de desempenho larval e de adultos da mariposa em condições controlados no laboratório. Nós realizamos uma análise química detalhada, que nos permitiu medir a quantidade de APs sequestrados e analisar o perfil qualitativo do metabolismo e processamento bioquímico destes nas diferentes fases de ontogenia de *U. ornatix*. Desse modo, podemos associar a concentração e estrutura

do AP metabolizado pelo inseto com o efeito no desempenho de larvas e adultos e a atividade anti-predação. Para investigarmos como diferentes APs em diferentes concentrações consumidos por larvas de *U. ornatrix* influenciam a defesa contra predadores tanto de larvas quanto de adultos realizamos bioensaios com predadores invertebrados (as aranhas *N. clavipes* e *Lycosa erythrognatha*), e um modelo de predador vertebrado (pintinhos *Gallus gallus*). Adicionalmente, para verificar eventuais diferenças na estrutura/atividade destes APs metabolizados por *U. ornatrix*, realizamos bioensaios de predação com os APs purificados N-óxido aplicados topicamente em larvas palatáveis de *T. molitor* contra *N. clavipes*. Nós demonstramos neste trabalho que larvas de *U. ornatrix* possuem a capacidade de sequestrar diferentes estruturas de APs incorporados em dieta artificial. Os APs sequestrados são armazenados eficientemente e dependendo da estrutura do alcaloide ele é transmitido pela larva até o estágio adulto sem modificações e parte é utilizado como precursor do hidroxidanaidal em machos. Nós verificamos que *U. ornatrix* possui a capacidade de modificar bioquimicamente os APs adquiridos da dieta, e biossintetizam “insect PAs”, que são utilizados na formação do hidroxidanaidal. Nossos resultados indicam ainda que o tipo estrutural de AP presente na dieta e a concentração deste, bem como o estágio de desenvolvimento afeta a aquisição de alcaloides por *U. ornatrix*. Apesar uma elevada capacidade bioquímica e metabólica em lidar com os APs da dieta, o desempenho de larvas e adultos não é afetado pelo tipo de alcaloide e a concentração na dieta. Nós mostramos que a defesa química de *U. ornatrix* nas diferentes fases de desenvolvimento contra diferentes predadores é influenciada tanto pelo tipo estrutural de AP e a concentração dos alcaloides na dieta, bem como a força de predação exercida. Larvas e adultos são protegidos igualmente e o sexo não influencia na defesa contra predação.

Na segunda abordagem, nós verificamos o efeito de diferentes estruturas de APs no desempenho de *U. ornatrix* sob a perspectiva da ecologia nutricional (Scriber & Slansky

1981). Nós utilizamos uma dieta artificial onde podemos controlar com precisão os fatores nutricionais qualitativos (natureza química do nutriente) e quantitativos (proporção de alimento convertido em biomassa). Nós manipulamos a composição química da dieta incorporando os APs com diferentes estruturas, citados anteriormente, em concentrações molares equivalentes e do mesmo modo da primeira abordagem medimos vários parâmetros de desempenho de larvas e adultos. Nós verificamos que o tipo estrutural de AP na dieta afeta o desempenho de *U. ornatrix*. Estes resultados estão fortemente associados com os parâmetros fisiológicos e nutricionais do consumo e utilização de alimento por *U. ornatrix*. Nossos resultados sugerem que a relação entre os custos em termos de crescimento associados ao sequestro de diferentes APs é consequência da eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatrix* em lidar com as diferentes estruturas de alcaloides.

No terceiro capítulo, nós investigamos o sequestro e transformações bioquímicas de APs pela mariposa Neotropical especialista *S. figulina*, que enquanto larva se alimenta de folhas de *H. transalpinum*, assim como o papel destes compostos na defesa contra diferentes predadores. Nós combinamos uma detalhada análise química da concentração e do perfil qualitativo de APs presentes na planta hospedeira e nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* com bioensaios de predação em campo e laboratório com os mesmos predadores citados anteriormente. Nossos resultados mostram que *S. figulina* possui uma elevada plasticidade metabólica e bioquímica em sequestrar e processar os APs em *H. transalpinum*. Os APs foram detectados em todo ciclo de vida da mariposa e o perfil qualitativo dos APs presentes em diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* mostrou-se completamente distinto do padrão da planta hospedeira. Os APs são sequestrados pela larva e são metabolizados especificamente por dois mecanismos principais: (1) inversão estereoquímica de ésteres de heliotridina com configuração (7*S*) e/ou (3'*R*) para uma configuração (7*R*) e/ou (3'*S*), e (2) hidrólise da ligação éster e formação de alcaloides

característicos de insetos (“insect PAs”) a partir da re-esterificação da base necina da planta com um ácido nécico do próprio inseto. Estes alcaloides protegem larvas e adultos de *S. figulina* contra os predadores utilizados. Nós discutimos esses resultados em termos da capacidade bioquímica e metabólica de *S. figulina* em processar diferentes APs e a importância funcional destes mecanismos frente a pressões seletivas de diferentes predadores.

## REFERÊNCIAS

- Berenbaum MR, Zangerl AR (1993) Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance. *Oecologia* 95: 370-375.
- Bernays EA, Chapman RF, Lamunyon CW, Hartmann T (2003) Taste receptors for pyrrolizidine alkaloids in a monophagous caterpillar. *J Chem Ecol* 29: 1709-1722.
- Bezzarides A, Eisner T (2002) Apportionment of nuptial alkaloidal gifts by a multiply-mated female moth (*Utetheisa ornatrix*): eggs individually receive alkaloid from more than one male source. *Chemoecology*. 12: 213-218.
- Biller A, Boppré M, Witte L, Hartmann T (1994) Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*: chemical and chemoecological aspects. *Phytochemistry* 35: 615-619.
- Cogni R, Futuyma DJ (2009) Local adaptation in an insect plant interaction depends on the spatial scale. *Biol J Linn Soc* 97: 494-502.
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ (2011) Varying herbivore population structure correlates with lack of local adaptation in a geographic variable plant-herbivore interaction. *PLoS One* 6: e29220.
- Conner WE, Weller SJ (2004) A quest for alkaloids: the curious relationship of tiger moths and plants containing pyrrolizidine alkaloids. In: Cardé RT, Millar JG (eds) *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge University Press, New York.
- Després L, David JP, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22: 298-307.
- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Eisner T, Meinwald J (2003) Alkaloid-derived pheromones and sexual selection in Lepidoptera. In Blomquist GJ, Vogt RG (ed) *Insect pheromone biochemistry and*

- molecular biology. Academic Press, Florida. pp. 341-368.
- Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am Nat* 125: 1-15.
- Flores AS, Tozzi AMGA, Trigo JR (2009) Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: chemotaxonomic significance. *Biochem Syst Ecol* 37: 459-469.
- Fordyce JA, Nice CC (2008) Antagonistic, stage-specific selection on defensive chemical sequestration in a toxic butterfly. *Evolution* 62: 1610–1617.
- Frei H, Luthy J, Brauchli J, Zweifel U, Wurgler FE, Schlatter C (1992) Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem Biol Interact* 83: 1-22.
- Gatehouse JA (2002) Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol* 156: 145–169.
- Harborne JB (1993) Introduction to Ecological Biochemistry, fourth edition. London: Elsevier Academic Press.
- Hartmann T (2009) Pyrrolizidine alkaloids: The successful adoption of a plant chemical defense. In: Conner WE (ed) Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae, Oxford University Press, New York, pp 55-81.
- Hartmann T, Biller A, Witte L, Ernst L, Boppré M (1990) Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). *Biochem Syst Ecol* 18: 549-554.
- Hartmann T, Theuring C, Bernays EA (2003) Are insect-synthesized retronecine esters (creatonotines) the precursors of the male courtship pheromone in the arctiid moth *Estigmene acrea*? *J Chem Ecol* 29: 2603–2608.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays EA, Singer MS (2005a) Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous

- arctiid *Grammia geneura*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 1083-1099.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Ernst L, Singer MS, Bernays EA (2004) Acquired and partially *de novo* synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. *J Chem Ecol* 30: 229-254.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer MS, Bernays EA (2005b) Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 391-411.
- Hartmann T, Witte L (1995) Chemistry, biology and chemoeology of the pyrrolizidine alkaloids. In: Pelletier SW (ed) *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, vol 9. Pergamon Press, Oxford, pp 155-233.
- Harvey PH, Pagel MD (1991) *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford Series in Ecology and Evolution, vol. 1, Oxford University Press.
- Holloway GJ, de Jong P, Brakefield PM, de Vos H (1991) Chemical defense in ladybird beetles (Coccinellidae). I. Distribution of coccinelline and individual variation in defense in 7-spot ladybirds (*Coccinella septempunctata*). *Chemoecology* 2: 7–14.
- Holloway GJ, de Jong PW, Ottenheim M (1993) The genetics and cost of chemical defense in the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.). *Evolution* 47:1229–1239.
- Iyengar VK, Eisner T (2002a) Parental body mass as a determinant of egg size and egg output in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *J Insect Behav* 15: 309-318.
- Iyengar VK, Reeve HE, Eisner T (2002b) Paternal inheritance of a female moth's mating preference. *Nature* 419: 830-832.
- Joshi J, Vrieling K (2005) The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. *Ecol Lett* 8: 704–714.
- Karban R, Baldwin IT (1997) *Induced responses to herbivory*. The University of Chicago

Press, Chicago.

Klitzke CF, Trigo JR (2000) New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. *Biochem Syst Ecol* 28: 313-318.

Koricheva J (2002) Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defenses. *Ecology* 83: 176-190.

Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, Hartmann T (1997) The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur J Biochem* 245: 626-636.

Longson CG, Joss JMP (2006) Optimal toxicity in animals: predicting the optimal level of chemical defenses. *Funct Ecol* 20: 731-735.

Macel M (2011) Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochem Rev* 10: 75-82.

Mattocks AR (1986) *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. London, Academic Press.

Naumann C, Hartmann T, Ober D (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6085-6090.

Nishida R (2002) Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 47: 57-92.

Opitz SEW, Müller C (2009) Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* 19: 117-154.

Price PW, Bouton CE, Gross P, McPherson BA, Thompson JN, Weis AE (1980) Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annu Rev Ecol Sys.* 11: 41-65.

- Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP (2004) Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis warning signals and mimicry. Oxford University Press, Oxford.
- Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M (2005) Insect–Plant Biology. Oxford: Oxford University Press.
- Schulz S, Francke W, Boppré M, Eisner T, Meinwald J (1993) Insect pheromone biosynthesis: stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). Proc Natl Acad Sci USA 90: 6834-6838.
- Scriber J M, Slansky F (1981) The nutritional ecology of immature insects. Annu Rev Entomol 26: 183–211.
- Sehlmeyer S, Wang L, Langel D, Heckel DG, Mohagheghi H, Petschenka G, Ober D (2010) Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the arctiids (Lepidoptera). PLoS One 5: e10435.
- Somerville C, Somerville S (1999) Plant functional genomics. Science 285: 380–383.
- Stegelmeier BL, Edgar J, Colegate SM, Gardner D R, Schoch TK, Coulombe RA, Molyneux R J (1999) Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. J Nat Toxins 8: 95-116.
- Trigo JR (2008) Chemical ecology of ithomiine butterflies. In: Epifano F (ed) Current trends in phytochemistry. Research Signpost, Kerala.
- Trigo JR (2011) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. Phytochem Rev 10: 83-98.
- Trigo JR, Brown KS, Henriques S, Barata LES (1996) Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in ithomiinae butterflies. Biochem Syst Ecol 24: 181-188.
- Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Barata LES (1993) Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. J Chem Ecol 19: 669-679.

- Trigo JR, Barata LES, Brown KS (1994) Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): specificity and evolutionary significance. *J Chem Ecol* 20: 2883–2899.
- Van der Meijden E (1996) Plant defense, an evolutionary dilemma: contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomol Exp Appl* 80: 307-310.
- van Joop JJA, Casas J, Pincebourde S (2005) Nutritional ecology of insect-plant interactions: persistent handicaps and the need for innovative approaches. *Oikos* 108: 194-201.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Witte L, Ehmke A, Hartmann T (1990) Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids; from plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften* 77: 540-543.
- Wittstock U, Gershenzon J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 5: 300–307.

# Feeding on host plants with different concentrations and structures of pyrrolizidine alkaloids impacts the chemical-defense effectiveness of a specialist herbivore

Carlos H. Z. Martins<sup>1,2¶</sup>, Beatriz P. Cunha<sup>3&</sup>, Vera N. Solferini<sup>3&</sup>, José R. Trigo<sup>1¶\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13084-970, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author

E-mail: [trigo@unicamp.br](mailto:trigo@unicamp.br) (JRT)

¶These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work.

## Abstract

Sequestration of chemical defenses from host plants is a strategy widely used by herbivorous insects to avoid predation. Larvae of the arctiine moth *Utetheisa ornatrix* feeding on unripe seeds and leaves of species of *Crotalaria pallida*, *C. incana* and *C. spectabilis* (Leguminosae) sequester *N*-oxides of pyrrolizidine alkaloids (PAs) from these host plants, and transfer them to adults through the pupal stage. PAs confer protection against predation on all life stages of *U. ornatrix*. As *U. ornatrix* also uses other *Crotalaria* species as host plants, we evaluated whether the PA chemical defense against predation is independent of host plant use. We fed larvae from hatching to pupation with either leaves or seeds of one of eight *Crotalaria* species (*C. incana*, *C. juncea*, *C. micans*, *C. ochroleuca*, *C. pallida*, *C. paulina*, *C. spectabilis*, and *C. vitellina*), and tested if adults were preyed upon or released by the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. We found that the protection against the spider was more effective in adults whose larvae fed on seeds, which had a higher PA concentration than leaves. The exceptions were adults from larvae fed on *C. paulina*, *C. spectabilis* and *C. vitellina* leaves, which showed high PA concentrations. With respect to the PA profile, we describe for the first time insect-PAs in *U. ornatrix*. These PAs, biosynthesized from the necine base retronecine of plant origin, or monocrotaline- and senecionine-type PAs sequestered from host plants, were equally active in moth chemical defense, in a dose-dependent manner. These results are also partially explained by host plant phylogeny, since PAs of the host plants do have a phylogenetic signal (clades with high and low PA concentrations in leaves) which is reflected in the adult defense.

## Introduction

Defenses evolved by animals to avoid predation are ubiquitous in nature, and different defensive strategies have evolved in response to different life styles. The myriad defensive strategies include avoiding detection, preventing attack, and deceiving predators [1]. Some herbivorous insects feeding on chemically protected host plants are able to overcome these plant defenses by sequestering plant secondary compounds, and using them for their own defense against predator attack [2-4]. Sequestration may have evolved independently in different taxa of herbivorous insects. It predominates in Coleoptera and Lepidoptera, but also occurs frequently in the Heteroptera, Hymenoptera, Orthoptera and Sternorrhyncha [4]. The sequestered defensive compounds comprise a vast array of natural products of different biosynthetic pathways, such as cardenolides, cyanogenic and iridoid glycosides, aristolochic acids, glucosinolates and pyrrolizidine alkaloids. These substances are effective against a variety of predators, ranging from invertebrates including spiders and ants, to vertebrates including birds and mammals [2-5].

Generally, the effectiveness of chemical defenses against predation is dose- and/or structure-dependent [3]. High concentrations of sequestered compounds in the herbivorous prey are more effective against predators, and their effectiveness is usually related to the concentration of these compounds in the host plants. Different structures of the same class of compounds may also show different activities against predation. For instance, a palatability spectrum of the monarch and queen butterflies, *Danaus plexippus* and *D. gilippus*, was found to be associated with the amount of cardenolides sequestered from different host plants [6,7]. This pattern has been also observed in the adults of the nymphalid butterfly *Euphydryas phaeton*, which acquired defensive iridoid glycosides as larvae from two different host plants [8,9]; and in the adults of the heliconiine butterfly *Heliconius erato*, whose larvae feed on four species of *Passiflora* [10]. Additionally, Silva and Trigo [11] demonstrated that pyrrolizidine

alkaloids have a positive dose-dependent activity in the protection of insects against the orb-weaving spider *Nephila clavipes* (Nephilidae). In the same study, they showed that different PA structures had different antipredation activities.

Among the defensive compounds sequestered by herbivorous insects, the role of pyrrolizidine alkaloids (PAs) has been well documented [12]. These compounds are produced by plants in several families (e.g. Asteraceae, Boraginaceae and Leguminosae), and are sequestered by specialist grasshoppers, hemipterans, beetles, moths and butterflies [5,13,14], where they show defensive and sexual communication functions [14]. PAs in specialized insects are always present in *N*-oxide form [15]. Many arctiine moths convert PAs sequestered from their larval host plants into “insect-PAs” in which the acid components of the alkaloids are replaced by small, branched aliphatic 2-hydroxy acids of insect origin [16]. These PAs of insect origin are precursors of the male sex pheromone in these moths [16].

The arctiine rattlebox moth *Utetheisa ornatrix* is one of the most-studied species with respect to its ecological dependence on PAs [5,14,17-19]. *U. ornatrix* occurs in the Neotropics and warm Nearctic regions [20], where it feeds on many species of *Crotalaria* legumes [21]. The genus *Crotalaria* has a Pantropical distribution, and some members have colonized the warmer parts of the Nearctic region [22]. The larvae of *U. ornatrix* sequester these alkaloids, and pass them to pupae and adults. During mating, males transfer PAs to females, which transfer them to the eggs. Therefore, all life stages of *U. ornatrix* are protected by PAs against predators [14]. Eisner [23] first demonstrated that the unpalatability of *U. ornatrix* adults is due to PAs in their tissues, and that the alkaloid originates from the larval host plant, *Crotalaria pallida* (formerly *C. mucronata*). Eisner found that adults of *U. ornatrix* were protected against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*, as well as from other spiders, and birds. Additional evidence of the defensive role of PAs in *U. ornatrix* came from bioassays, with PAs topically applied on palatable organisms or by offering diets with or

without PAs to PA-specialist insects, and testing these organisms against various predators [5].

Although it is suggested that the unpalatability of *U. ornatrix* may be closely related to the amount of PAs in their host-plant tissues, few studies have demonstrated this relationship. Eisner et al. [14,23-25] tested the adults, with and without PAs, against spiders and birds, but no dose-activity bioassay was carried out. Ferro et al. [26] found that the differences in adult palatability increased when their larvae fed on unripe seeds and leaves of *C. pallida*. The leaves had a lower PA content than unripe seeds, and consequently the larvae fed on leaves were more consumed by *N. clavipes* than those fed on unripe seeds. Likewise, Hristov and Conner [27] also showed that *U. ornatrix* fed on leaves of *C. spectabilis* were more predated by the bat *Eptesicus fuscus* compared to moths fed on seeds; moths raised in a diet free of PAs were palatable to the bats.

An important issue that remains unclear is the role of PA structure in the chemical defense of *U. ornatrix*. Do different structures confer different levels of defense? Eisner et al. [23-25] raised *U. ornatrix* on its usaramine PA-containing host plant (*C. pallida*) and observed that the moth was rejected by the spiders *N. clavipes* and *Lycosa ceratiola*, while moths raised on a diet free of PAs were preyed upon. Similar results were found for *L. ceratiola*, which released *U. ornatrix* raised on a diet supplied with PA monocrotaline, the main PA of *C. spectabilis* [24,25]. In two other studies on chemical defense of *U. ornatrix* adults, larvae were also raised on *C. pallida* or *C. spectabilis*, and therefore the PAs involved in the defense were respectively, usaramine and monocrotaline [26,27]. However, larvae of *U. ornatrix* can feed on many *Crotalaria* species [21,28], with different PA concentrations and profiles [29]. The finding that *C. pallida* and *C. spectabilis* conferred similar levels of defense in spite of containing different PAs led us to hypothesize that the structure is unimportant in determining palatability. Our predictions were: (1) adults from larvae that fed on plants or

plant parts with high PA contents would be better defended than those that fed on plants or plant parts with low PA contents, and (2) PA structure would play no role in the moth chemical defenses.

Another point that has not been examined in studies of chemical defenses of herbivores sequestered from their host plants is the role of host plant phylogeny. It would be expected that phylogenetically related host plants produce similar compounds available for sequestration by insects. Therefore we cannot consider each host plant species as independent for comparative analysis [e.g. 30]. If phylogenetic inertia is strong, the potential adaptations that related species may evolve will be similarly constrained, with the effect that species cannot be regarded as independent of each other [31]. Consequently, it was necessary to take into account the host plant phylogeny, in order to compare the sequestered chemical defenses in an herbivorous insect. To our knowledge, this approach has never been taken in published studies. For example, even for the monarch butterfly, a well-studied model of sequestered chemical compounds, the connection between insect defenses and host plant phylogenetic relationships has never been explored, although the phylogenetic trends related to chemical defenses are well known in *Asclepias* [32,33]. Therefore, we explored the question of whether *Crotalaria* phylogeny directs any trend for the chemical defenses of *U. ornatix*. We hypothesized that moths that fed on phylogenetically related host plants would show similar defensive patterns.

To address our hypothesis and predictions, we fed larvae on leaves or seeds of eight different *Crotalaria* species found in the Neotropics, which were native, non-native or of uncertain origin, with different PA concentrations and profiles [29]. The adults that emerged from larvae fed the different diets were offered to the spider *N. clavipes* in a predation bioassay. We analyzed the PA concentrations and profiles for *U. ornatix* adults and *Crotalaria* species, and correlated the PA concentrations of adults with the PA contents of the

plant parts they fed on as larvae. We also correlated the PA concentration and profile between the moths and the spider response in the predator bioassay. This correlation will or will not support our first prediction. Since we found different classes of PAs in *U. ornatix*, we also bioassayed the three most common classes against the spider to test our second prediction. Finally, we mapped the PA profiles and concentrations in *Crotalaria* species, the PA concentrations in the moth, and the defensive response of *N. clavipes* against an independent phylogenetic hypothesis for the eight *Crotalaria* species, in order to test our last hypothesis.

## Materials and Methods

### Study system

The rattlebox moth *Utetheisa ornatix* (Erebidae: Arctiinae) is primarily Neotropical and extends to warmer areas of the Nearctic region [20]. *U. ornatix*, together with five species that occur only in the Galapagos Islands, are the extant *Utetheisa* species in the Neotropics [34,35]. The adults are generally found flying near patches of *Crotalaria* in pastures, the edge of woods and roadsides, where the larvae can be found feeding on both leaves or seeds inside the unripe pods of *Crotalaria* [21,26,28].

*Crotalaria* (Leguminosae: Papilionoideae: Crotalarieae) is a Pantropical genus of weeds, comprising approximately 702 species [22,36]. In the Neotropics, particularly in Brazil, 31 native and 11 non-native species have been recorded [37]. *Crotalaria* species are rich in PAs [34], which are found in higher concentrations in seeds than in leaves [26]. In addition to PAs, *Crotalaria* species have other defensive traits against herbivores including antifeeding deterrents such as lectins [38], non-protein amino acids [39] and protease inhibitors [40]. They also have extrafloral nectaries (EFNs) that attract predatory ants and wasps [26,41-43]. We used eight species of *Crotalaria*, including three natives, three non-

natives, and two with uncertain origins (Table 1), that have been planted in an open area near the Animal Biology Department, Institute of Biology at the State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil (22°49'15.38"S, 047°04'8.87"W). In natural environments, we have observed *U. ornatix* using *C. incana*, *C. micans*, *C. spectabilis*, *C. pallida* and *C. vitellina* as host plants. For the other three species, we have no information about their natural use by *U. ornatix*.

The Neotropical orb-weaving spider *Nephila clavipes* (Nephilidae) is a predator that builds its web in forest clearings and corridors, which are flight paths for insects [44]. This spider preys on grasshoppers, bees, wasps, moths, and butterflies, but is able to discriminate PA-containing insects, releasing them unharmed [5] (Fig. 1). In the edges of woods, this spider co-occurs with *U. ornatix*.

The permit for research with wild animals was provided by IBAMA-ICMBio (Ministério do Meio Ambiente, Brazil).

## **Rearing *Utetheisa ornatix* larvae**

We obtained larvae of *U. ornatix* from adults collected on the Fazenda Santa Mariana, Campinas, São Paulo, Brazil (22°47'02.91"S, 47°00'36.03"W), where the host plant *C. pallida* is abundant. We brought the adults to the laboratory, sexed them following Travassos [45], and allowed them to mate (20 males and 10 females per cage) in a paper cage (ca. 3.2 L) following Cogni [28]. We supplied food in a vial containing 5.0% aqueous honey. After 3-4 days, the adults started to oviposit on the paper-cage surfaces. The eggs were mixed to randomize the parental origin. After eclosion, we reared the first instars on leaves or unripe seeds of one of the eight species of *Crotalaria*. We also reared a group of first instars on a PA-free diet, following Cogni et al. [46]. For each treatment (diets of leaves or unripe seeds of each species of *Crotalaria*), we reared ca. 20 individuals in a plastic container (6 cm high, 20

cm diameter) until pupation. For some treatments, depending on the availability of seeds and leaves, we had 2 or 3 containers, giving 40-60 individuals per treatment. The larvae were fed *ad libitum*. We inspected the containers daily, removing feces and dead individuals, and replacing the leaves or seeds with new ones. We moved the pupae to another container with the same dimensions until adult emergence, since the larvae can cannibalize pupae [47]. We carried out the same procedure for pupae from the PA-free diet. We moved newly emerged adults to paper cages, separating them by treatment and sex, until the spider-predation bioassays. We kept both the paper cages with adults and the plastic containers with larvae and host plants, or pupae, at room temperature.

### **Predation bioassay with living moths**

We carried out the bioassays with *Nephila clavipes* in a small patch of woods in Campinas (22°48'21.26"S, 47°4'43.12"W) from March to May in 2012 and 2013, when the spiders were abundant. We conducted all bioassays between 09:00 and 16:00 hs. We used only adult female spiders that responded immediately when any prey was tossed into their web. We did not use spiders that were in the course of feeding on a prey insect, but we did not control for satiation before each bioassay. We used around 80 spiders for the bioassays. Since the number of spiders was a limiting factor, sometimes we repeated the bioassays with the same spider, but each individual was used only once per week. We bioassayed 481 adult moths, testing around 20 individuals for each sex, host plant and plant part. We made a small cut in the moth's hind wings before placing it on the web, to prevent the moth from flying away if released by the spider. We placed the moth on the web, and recorded if it was eaten or released. We considered the spider response to be predation when it bit, wrapped and killed the moth. When the spider cut the web around the moth after touching it and freed it unharmed, we recorded the response as a release. We did not record the rejection behavior described by

Vasconcellos-Neto and Lewinsohn [48] (the prey was initially sucked and then freed), since the prey was removed from the web before this stage. If the spider released the moth, we offered a palatable freeze-killed mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as a control. We recorded the trial as a rejection only if the spider fed on the mealworm. If the spider killed the experimental moth, we did not use the control. When predation was recorded, we immediately removed the moth from the web and placed it in a 1.5-mL Eppendorf tube filled with MeOH for further PA analysis. All moths were recovered intact; even the parts bitten by the spider had no visible signs of damage. We also preserved the released moths in MeOH as above. We analyzed 310 individuals; 171 were not used for PA analysis, since they were lost after the spider bioassay.

## **Pyrrolizidine alkaloids: extraction, quantification, characterization and isolation**

To quantify the PAs, we extracted the freeze-dried samples of unripe seeds, leaves of host plants or adult moths three times with EtOH (10x volume:weight). We centrifuged the EtOH extract at 10,416 rcf for 10 min, and recovered the EtOH layer. We completed the EtOH layer to 20 mL and took an aliquot (0.1 or 1.0 mL) to carry out the colorimetric analysis according to Trigo et al. [49,50]. We used monocrotaline for the reference curve. The total PA concentration was given in  $\mu\text{g}$  of PAs/mg of dry weight.

For PA characterization by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), we extracted the plant or insect samples using the acid-base procedures described by Trigo et al. [49,50]. The GC-MS analysis was carried out in electron impact mode according to Flores et al. [29]. The retention indices and mass fragmentation patterns were compared with published descriptions (see Table 2, and references 29,51,52).

For PA characterization by liquid chromatography-mass spectrometry the samples were extracted in EtOH as above. The EtOH layer was evaporated in a rotaevaporator at 40°C, recovered with 1.5 mL 2% aqueous acetic acid and cleaned 3 times with the same volume of hexane. The acid solution was added to a clean 2-mL vial, capped, and stored at -20°C until LC-MS analysis. We used an Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, equipped with an Eclipse Plus C-18 column, 4.6 x 250 mm, 5 µm, and a guard column with the same phase, coupled with an Agilent 6130 single quadrupole in electrospray ionization mode. The column was kept at 40°C, and the injection volume was 5 to 50 µl. The PA was separated using a linear gradient containing aqueous 20 mM ammonium acetate and MeOH at flow rate 0.5 mL/min. The gradient started at 95% ammonium acetate:5% MeOH (3 min), MeOH was raised to 100% in 25 min, and kept at 100% for 3 min. The mass spectrometer was run in positive mode, scanning the product ions from 100–500 amu (see Table 2).

For the predation bioassays with pure PAs in *N*-oxide form, we isolated monocrotaline from *C. spectabilis*, integerrimine from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae: Senecioneae) and the putative mixture insect PAs creatonotine B: iso-creatonotine B (Fig. 2) from adults of *U. ornatrix* that fed as larvae on leaves and unripe seeds of *C. vitellina*. We extracted PAs using the acid-base procedure as described above, and isolated them using an adsorption column chromatograph (40 cm length, 2.5 cm diameter), using Silica Gel 70-325 mesh as the stationary phase, and a gradient from CHCl<sub>3</sub> to CHCl<sub>3</sub>:MeOH:Et<sub>3</sub>N 85:14:1 as the mobile phase. We followed the PAs in 10-mL fractions by silica-gel thin-layer chromatography with CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 85:14:1 as eluent and Dragendorff's reagent for detection. We *N*-oxidized the PAs and purified them using the procedure described by Craig and Puroshothaman [53].

## **Predation bioassay with pure pyrrolizidine alkaloids**

We found that adults of *U. ornatrix* generally contained PA *N*-oxides of monocrotaline and integerrimine types, and the specific mixture of insect PAs creatonotine B: iso-creatonotine B (see Results). We carried out predation bioassays with *N. clavipes* to determine if PA *N*-oxides with different structures had similar activity against the spider. The bioassays were carried out in the same area where we carried out the predation bioassay with living moths.

We treated palatable freeze-killed larvae of the mealworm *T. molitor* (hereafter baits) with 3.0 µg/mg dry weight of each alkaloid, which were obtained as described above. This concentration was determined by calculating the logistic regression of the *N. clavipes* response in relation to PA concentration in adults of *U. ornatrix* fed as larvae on one of the eight different host plants (see Statistical analyses), where at 3.0 µg/mg the probability of release by the spider was 87%. To evaluate whether the PA concentration also played any role in the chemical protection against the spider, we also bioassayed these PA *N*-oxides in a one-tenth concentration. Additionally, we conducted bioassays with 5.0 µg/mg *N*-oxide for the insect PA. All bioassays were conducted using 10 baits for each PA concentration. The PAs were diluted in MeOH and applied topically with a 10-µL syringe on the surface of the bait, which was killed by freezing. We used a MeOH-treated bait as a control to determine whether to accept the trial, as described above for the *N. clavipes* predation bioassay with living moths.

## **Host plant phylogenetic hypothesis and character mapping**

We mapped the characters of PAs involved in the chemical defenses of *U. ornatrix* in an independent phylogenetic hypothesis for the eight *Crotalaria* species. This procedure may reveal the evolutionary trends of mapped characters [54]. We did this only for those that were fed on leaves, as all individuals fed on seeds were well protected against the spider, regardless

of the host plant. As PA characters we used PA concentration (high > 3.0 µg/mg and low < 1.0 µg/mg) and PA type (monocrotaline, senecionine, senkerkine or insect PA) in all eight *Crotalaria* species and *U. ornatrix*, and the response of the predator *N. clavipes* in relation to *U. ornatrix* (percentage of release).

We constructed a phylogenetic hypothesis based on ITS sequences retrieved from GenBank for seven *Crotalaria* species and for the out-group *Bolusia amboensis* [36]. Total genomic DNA of *C. vitellina* (unavailable in GenBank) was extracted from fresh leaves, collected in the garden of UNICAMP, using the two-fold hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) method [55]. The nuclear ribosomal ITS region (ca. 700 bp) was amplified as described by le Roux et al. [36], using the primers ITS 17SE and ITS 26SE [56,57]. PCR products were purified with a GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and sequenced at the Center of Molecular Biology and Genetic Engineering, UNICAMP, using an automated capillary sequencer (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems). Complementary sequences were assembled and edited with the Muscle algorithm [58] in MEGA 6 [59]. The *C. vitellina* ITS sequence was submitted to GenBank (KR013000). This sequence was aligned visually with the sequences gathered in GenBank, using MEGA 6, and the most appropriate nucleotide substitution model for the set of sequences was determined with the same software. Phylogenetic analyses were carried out using Bayesian Inference (maximum posterior probability, MPP) in Beast v1.8.1 [60] for a total of 10 million generations, with tree sampling every 1 million generations. A Yule speciation process was assumed, as recommended for species-level phylogenies [61]. The HKY+I substitution model was used for the substitution rate, and the default prior distribution was used for all other parameters. Tracer v.1.6 [62] was used to assess convergence using a minimum ESS value of 200. After the analyses were completed, 10% of the trees were

removed as “burn-in”. The tree was visualized in FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## Statistical analysis

We analyzed the frequency of individuals predated or released, using a generalized linear model (GLM) with binomial distribution and logit function link, using the package “bbmle” in R 3.1.0 for Windows [63,64]. Different models were generated to assess the effects of the explanatory variables (host plant, plant part, and sex of moth) as well as interactions between and among these variables in the response variable frequency of individuals predated or released. The model host plant, host plant part, and interaction between these factors provided the lowest AIC (Akaike’s Information Criterion) value (= 0.0). Therefore, we used an 8 x 2 design, where the factors were host plants (eight levels) and the part of the host plants where the larvae fed (two levels).

We compared the response variable concentration of PAs ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) in moths between parts of plant (two levels) and host-plant treatments (eight levels) by a two-way ANOVA, using the Tukey post-hoc test [65]. We discharged the explanatory variable sex, using AIC as above. We ln-transformed the PA concentration (in  $\mu\text{g}/\text{g}$  to avoid values  $< 1$  in the ln transformation) to meet ANOVA assumptions [65]. A similar analysis was used to compare the PA concentration in the host plants. We calculated the nonlinear relationship between the PA concentration in *U. ornatrix* and the PA concentration in the leaves or seeds of the host plants, using the CurveExpert Professional 2.2.0.

We assessed the relationship between the *N. clavipes* response (predation or release) for individual adults of *U. ornatrix* feeding on each of eight different host plants and their PA concentrations, by a simple logistic regression [65]. We also tested this relationship after pooling the data for adults feeding on all host plants.

We asked if there is a relationship between the PA concentration in adults whose larvae fed on leaves or seeds and *N. clavipes* release, and if this relationship depended on the species of *Crotalaria*. We calculated this nonlinear relationship, as described above, using the mean PA concentration in adults whose larvae fed on leaves or seeds of each host plant and the percentage of adults released by the spider for each host plant.

As adults reared on different *Crotalaria* species showed a different PA profile with three PA classes (monocrotaline, senecionine and insect PA), we compared the response-variable percentage of adults released by *N. clavipes* in relation to the explanatory variables different PA structures (two levels) and concentration (two levels), topically applied to a palatable bait. We used a GLM binomial analysis as described above.

## Results

### Predation bioassay with living moths

The frequency of predation or release was affected by the host plant (GLM binomial,  $\chi^2 = 104.714$ ,  $df = 7$ ,  $P < 0.001$ ), the part of the plant consumed by the larvae ( $\chi^2 = 147.355$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) and by the interaction between these factors ( $\chi^2 = 19.274$ ,  $df = 7$ ,  $P = 0.007$ ).

Across all eight hosts, the spiders released 57.2% of the moths whose larvae fed on leaves, whereas 97.8% of the moths whose larvae fed on unripe seeds were released. The release percentage was lower for leaf feeders compared to seed feeders, for adults when larvae fed on *C. incana*, *C. micans*, *C. juncea*, *C. ochroleuca* and *C. pallida* (Fig. 3). Adults whose larvae fed on either leaves or seeds of *C. paulina*, *C. vitellina* and *C. spectabilis* were equally well protected against *N. clavipes* attacks; almost all individuals were released (Fig. 3).

## **Pyrrolizidine alkaloids: sequester from larval host plants and transformation**

### **Pyrrolizidine alkaloid concentration in moth and host plants**

The concentration of PAs differed among adults whose larvae fed on different host plants (two-way Anova,  $F_{7,294} = 118.50$ ,  $P < 0.001$ ). Adults feeding as larvae on *C. paulina* and *C. spectabilis* had higher concentrations of PAs compared with adults reared on other species (Tukey test  $P < 0.001$ , Fig. 4). The concentrations of PAs in adults also differed between plant parts fed to the larvae ( $F_{1,294} = 585.73$ ,  $P < 0.001$ ). The concentration of PAs was significantly higher in larvae feeding on seeds than in those feeding on leaves, but for larvae fed on *C. paulina*, *C. spectabilis* and *C. vitellina* we found no significant differences (Fig. 4). We found an interaction between host plants and plant parts ( $F_{7,294} = 39.51$ ,  $P < 0.001$ ). Adults whose larvae fed on leaves of *C. paulina*, *C. spectabilis* and *C. vitellina* showed significantly higher PA concentrations than those reared on leaves of other *Crotalaria* species (Tukey test,  $P < 0.001$ , Fig. 4); however, larvae fed on *C. vitellina* showed a significantly lower concentration than both *C. paulina* and *C. spectabilis* feeders ( $P < 0.001$ , Fig. 4).

The PA concentrations in host plants differed significantly among the *Crotalaria* species (two-way Anova,  $F_{7,149} = 678.2$ ,  $P < 0.001$ ), and were highest in *C. paulina* and *C. spectabilis* (Fig. 5). The concentration of PAs was significantly higher in seeds than in leaves ( $F_{1,149} = 596.2$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 5). A significant interaction between host species and host plant part occurred ( $F_{7,149} = 23.8$ ,  $P < 0.001$ ), due to the lack of a significant difference between plant parts for *C. juncea* (Tukey test,  $P = 0.147$ ).

There was a positive relationship between the PA concentration in *Crotalaria* species and *U. ornatix*, regardless of the part of the plant that the larvae fed on [nonlinear regression for larvae fed on leaves  $y = 20.39/(1+16.48e^{-1.55x})$ ,  $r^2 = 0.93$ , and for larvae fed on unripe

seeds  $y = 31.47/(1+2.58e^{-0.11x})$ ,  $r^2 = 0.88$ , Fig. 6]. However, we noted a maximum PA sequestration in *U. ornatix* (around 30  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), independently of an increase in the concentration of PAs in their host-plant seeds.

## Pyrrolizidine alkaloid sequestration and transformation

The transformation of sequestered PAs into insect PAs is host-plant dependent. Adults whose larvae fed on host plants with monocrotaline-type (*C. juncea*, *C. paulina* or *C. spectabilis*) or integerrimine-type PAs (*C. incana* or *C. ochroleuca*) sequestered a large amount of unchanged alkaloids; small amounts of biosynthesized insect PAs were also found (Table 3). Adults whose larvae fed on *C. vitellina*, a host plant whose alkaloids are mainly seco-PAs (alkaloids with an otonecine base, such as senkirkine) and the necine base retronecine, biosynthesize large amounts of insect PA iso-creatonotine and creatonotine B; the seco-PAs, which are not *N*-oxidized, were not sequestered, but eliminated in the feces (data not shown) (Table 3). Adults whose larvae fed on *C. micans* or *C. pallida* showed high amounts of insect PAs together with unchanged PAs originating from the host plant; *C. micans* contained retronecine and integerrimine as the main PAs, and *C. pallida* contained usaramine (Table 3). All PAs in moths and seeds were present in the *N*-oxide form, except for the seco-PAs in *C. vitellina* and 34.7% of the monocrotaline in *C. spectabilis*, which was present in free base form.

## Pyrrolizidine alkaloids and predator response

Across all adults whose larvae fed on different host plants and on different plant parts, the concentration of individual PAs in the moths had a significant positive relationship with release by *N. clavipes* (Table 4). For adults whose larvae fed on each species of *Crotalaria*, this pattern persisted, but for *C. vitellina* we found no significant relationship. For *C. paulina*

and *C. spectabilis*, no statistical analyses were possible, since adults whose larvae fed on these two host plants had a high PA concentration regardless of plant part, and 98 to 100% of them were released.

We found a significant positive relationship between the PA concentration of adults fed as larvae on leaves of different host plants and the percentage of adults released by *N. clavipes* [ $y = 99.5/(1+2.40e^{-0.72x})$ ,  $r^2 = 0.83$ , Fig. 7]. When larvae fed on host plants with a low PA concentration (*C. incana*, *C. micans*, *C. juncea*, *C. ochroleuca* and *C. pallida*), the percentage of release was low; conversely, when they fed on plants with a high PA concentration (*C. paulina*, *C. spectabilis* and *C. vitellina*), the percentage of release was high, nearly 100%.

## Predation bioassay with pure pyrrolizidine alkaloids

Baits treated with different *N*-oxide PA structures affected the percentages of baits (mealworm painted with PAs) released by *N. clavipes* (GLM binomial,  $\chi^2 = 9.692$ ,  $P = 0.008$ ). Different PA concentrations also influenced the percentage of baits released by the spiders ( $\chi^2 = 27.442$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ); while no interaction between factors was observed ( $\chi^2 = 0.008$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.996$ ). *N. clavipes* released 100% of the baits treated with 3.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  *N*-oxides of monocrotaline or integerrimine, and 70% of the baits treated with the insect PA mixture creatonotine B: iso-creatotine B. For 0.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , we found 60% release for monocrotaline, 50% for integerrimine, and 10% for the insect PAs (Fig. 8). At the concentration of 5.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , *N. clavipes* released 100% of baits treated with creatonotine B: iso-creatotine B.

## Host plant phylogenetic hypothesis and character mapping

The eight species of *Crotalaria* assessed in this study were separated into three main clades, all highly supported by posterior probability values (Fig. 9). Clade 1 included the species *C.*

*paulina*, *C. spectabilis* and *C. juncea*, which showed monocrotaline-type PAs. High PA concentrations in leaves were found in *C. paulina* and *C. spectabilis*, but not in *C. juncea*. The moths feeding on leaves of plants of Clade 1 showed monocrotaline type PAs and a high PA concentration; most of these moths were released unharmed by the spiders. Clade 2 included the species *C. micans*, *C. ochroleuca*, *C. pallida* and *C. incana*, which contained senecionine-type PAs and small amounts of PA in the leaves. The moths reared on plants of this clade showed small PA amounts compared to those from plants of Clade 1, but a variation according to the class of PAs: adults reared on *C. micans* and *C. pallida* showed large amounts of insect PAs in the body, while the class senecionine was the main PA type found in adults reared on *C. ochroleuca* and *C. incana*; some of the adults were released by the spiders. Clade 3 included a single species, *C. vitellina*, which had seco-PAs and small amounts of PAs in the leaves. However, the PA content in moths reared on leaves of *C. vitellina* was high, with large amounts of insect PAs, and the spiders released almost all adults reared on this host species.

## Discussion

Our results indicated that PAs sequestered by *U. ornatix* provide active chemical defense against predation, in a dose-dependent manner. The concentration of PAs in host plants where the larvae fed is a crucial factor for enhancing adult defense. Adults whose larvae fed on unripe seeds were almost 100% protected against *N. clavipes*, and showed high PA contents in their tissues. However, for those adults whose larvae fed on leaves, the protection against spider predation decreased nearly 40%; these adults, not coincidentally, showed low PA contents in their tissues. These results demonstrated that the high PA concentration in host plant seeds and low concentration in leaves might drive the spider response to *U. ornatix*.

Importantly, those adults whose larvae fed on leaves of *C. paulina*, *C. spectabilis* and *C. vitellina* had PA contents above 7.0 µg/mg in their tissues, and were well protected against the spider. The high content of PAs in *C. paulina* and *C. spectabilis* leaves may explain this protective effect. However, this was not the case for *C. vitellina*; this species had seco-PAs as the main compounds, together with retronecine. *U. ornatix* did not sequester the seco-PAs, but they showed a high content of insect PAs biosynthesized from retronecine, which maximized their chemical defense. Although it is well known that PAs are responsible for the chemical defense of *U. ornatix* and other arctiine moths [5,14,17], a dose-dependent approach has been less thoroughly documented. For instance, Hristov and Conner [27] demonstrated that when larvae fed on *C. spectabilis* seeds, the adults were less palatable to bats compared to adults whose larvae fed on leaves. Ferro et al. [26] found similar results when bioassaying *U. ornatix* reared on *C. pallida* against the spider *N. clavipes*. Additionally, Dussourd et al. [66] described the same pattern for *U. ornatix* eggs: those with a high amount of monocrotaline were rejected by the predaceous coccinellid beetle *Coleomegilla maculata*, but those with a low content were preyed upon. Pure PAs topically applied in a dose-dependent manner on palatable baits and offered to *N. clavipes* showed similar results [11]; there was a positive relationship between PA concentration and the *N. clavipes* release response using pure PAs.

The dose-dependence response raised other questions: what is the amount needed to elicit the predator's release response, and is there a threshold of sequestration by the moth? The spiders usually released adults that contained over 3.0 µg/mg PAs. However, adults whose larvae fed on *C. paulina* and *C. spectabilis* seeds showed ten times more PAs in their bodies. Feeding on high PA concentrations may not impose costs to *U. ornatix* [47], and therefore larvae may prefer diets with a high PA content over diets with a low PA content [67]. However, larvae feeding on host plants with a very high PA concentration, such as in

leaves and seeds of *C. paulina* and *C. spectabilis*, showed a sequestration threshold. Above 30 µg/mg of PA concentration in their diet, the larvae were unable to sequester more PAs. Malcolm [68] found a similar pattern for the monarch butterfly *Danaus plexippus* fed as larvae on milkweed *Asclepias* host plants with different cardenolide levels. Monarchs sequester cardenolides from milkweed species with low cardenolide contents, but when the plant increases the cardenolide content more than three to fourfold, monarchs reach an upper asymptote for sequestration. The likelihood of an uptake threshold in *U. ornatix*, to reduce the costs of sequestration and metabolism (e.g. *N*-oxidation), deserves further evaluation. Additionally, we know little about the threshold response of other potential predators of *U. ornatix*. Our results showed that above 3.0 µg/mg, adults were released by *N. clavipes*. However, the bat *Eptesicus fuscus* preyed on 70% of the adults of *U. ornatix* from larvae fed on *C. spectabilis* leaves, and on 55% of the adults whose larvae fed on seeds [27]. Assuming that all *C. spectabilis* have a similar PA content, *E. fuscus* seems to tolerate a high concentration of PAs in relation to *N. clavipes*, which released all moths whose larvae fed on *C. spectabilis*. Therefore, sequestering a high amount of PAs may maximize the chemical defense against a broader predator spectrum. Furthermore, male moths biosynthesized the sex pheromone hydroxidanaidal from PAs [69] and passed on PAs to females as a nuptial gift; in turn, females endowed their eggs with this defense [66]. We suggest that the multiple uses of PAs by *U. ornatix* may be responsible for the higher sequestration threshold.

To our knowledge, other pure defensive compounds sequestered from larval host plants by insects have not been tested in a dose-dependent manner. The closest example of a dose-dependent mechanism is found in the *Asclepias-Danaus* systems, where cardiac glycosides are sequestered from host plants of the subfamily Asclepiadoideae to protect *Danaus plexippus* against predation by birds [6]. Brower et al. [6] showed that the degree of unpalatability of the butterfly was linked to its host plants. However, there was a mismatch in

the amount of cardenolides sequestered that caused unpalatability in *D. plexippus* and the cardenolide concentration in the host plants [68]. The low degree of unpalatability was attributed to the host plant with high cardenolide content, which was a non-native plant, and therefore they did not share a long evolutionary history [68].

The PA profile of adults of *U. ornatrix* varies in relation to the PA profiles of their larval host plant. The sequestration of unchanged PAs or transformation of plant PAs into insect PAs is also variable, as found for other arctiines [51,52,70,71]. Which PA is present in the adults seems to be unimportant for *U. ornatrix* chemical defense. Both *N*-oxides of monocrotaline and senecionine showed similar defensive efficiencies against *N. clavipes*. When the larvae feed on innocuous PAs such as retronecine, they are able to compensate for the structural inactivity by manufacturing their own PAs from plant precursors. These insect PAs exhibited efficacy comparable to that of monocrotaline- and senecionine-type PAs in protecting the moth against the spider. At high concentrations, analogous to those found in adults whose larvae fed on unripe seeds (3.0 µg/mg), 80-100% of the baits treated with these alkaloids were released by the spider, irrespective of PA type. With a one-tenth concentration (0.3 µg/mg), around 50% of the baits were released when the PAs were monocrotaline and senecionine, and 10% for the insect PAs tested. Siva and Trigo [11], using *N. clavipes* as the predator, found that a mixture of senecionine:integerrimine *N*-oxide at 1.0 µg/mg led to 100% release of baits treated with this mixture.

Insect PAs constitute an important defensive mechanism. These biosynthesized insect-specific PAs are produced by several arctiine moths, through the esterification of necine bases derived from plant PAs with necic acids of insect origin [16]. These alkaloids have never been reported for *U. ornatrix*, and we found them in adults fed as larvae on all eight *Crotalaria* species. Insect PAs are reported as precursors of PA-derived pheromones [6, 53], although both males and females showed these alkaloids. Their role as defensive compounds, however,

has received little attention [e.g. 11]. Our study demonstrated that this kind of PA is important for chemical defense of *U. ornatix*. For example, those adults fed as larvae on *C. vitellina* showed high insect PAs and low amounts of retronecine, and were efficiently protected against *N. clavipes*. An *N*-oxide mixture of creatonotine B:iso-creatonotine B, in a similar concentration to those found in *U. ornatix* fed on *C. vitellina* and topically applied on a palatable prey, also showed 100% efficiency against *N. clavipes*. It is known that retronecine is not active against *N. clavipes* predation, but insect PAs are [11]. Therefore, the transformation of necine bases into insect PAs may have been selected under predation pressure. Similarly to other PA compounds sequestered from plants, these insect-PAs have a dual role: chemical protection against predators, and precursors of sex pheromones in males of specialist lepidopterans.

Finally, the sequestration of defensive PAs by *U. ornatix* from *Crotalaria* species is linked with *Crotalaria* phylogeny to some extent. Our phylogenetic analysis with the eight *Crotalaria* species showed one clade with high leaf PA content and another clade with low leaf PA content; both clades showed high PA contents in seeds. *Crotalaria* phylogeny may affect the chemical defense of *U. ornatix*, when larvae feed on leaves, but not on seeds. Therefore, we can expect that if all other traits are equal, larvae would feed on both leaves and seeds of plants from clades with high PA content in the leaves, and would feed only on seeds in species from the clade with low leaf PA concentration. The extent to which the selective pressure of *U. ornatix* on *Crotalaria* species drove the differences in PA concentration and profile among the *Crotalaria* species remains to be determined. For example, it is unknown if the shared evolutionary history between *Crotalaria* and *U. ornatix* could have coevolved, affecting the chemical defenses in both the plant and the moth. On the other hand, when *U. ornatix* or its ancestral line began to use *Crotalaria* as host plants, the patterns of plant PA

defense could have already been established due to other selective forces, e.g. other herbivores.

In conclusion, the main factor in the chemical defense of *U. ornatix* is the amount of PA sequestered or transformed from their host plants. Feeding on plants or parts of plants with high PA contents enhances the protection of *U. ornatix* against predators. The presence of a non-active PA, such as retronecine, may not constitute a constraint on *U. ornatix* chemical defense. The moth overcomes these limitations by maximizing the production of insect PAs, which have an antipredator role. Another constraint could be non-native *Crotalaria* host plants that impair both larval and adult performance, increasing the development time and decreasing the pupal weight [21, J.R. Trigo, personal observation]. However, this impairment may not affect the chemical defense of adults when the plants contain enough PAs to be sequestered by larvae. We suggest that the high degree of specialization of *U. ornatix* on PAs in *Crotalaria* led to an efficient uptake of these compounds, independently of other nutritional or toxic constraints on its larval diet.

## Acknowledgments

We thank José Carlos da Silva and Danilo Reali for help with *Crotalaria* cultivation and *Nephila* bioassays. Monica Kersch-Becker, Daniela Rodrigues, Rodrigo Cogni, Karina Brandão and three anonymous reviewers made valuable comments on the first draft. We also thank Gustavo Romero and Bruna Ramos, who helped with statistical analysis in R; Andreia Flores, who kindly supplied *Crotalaria* seeds and identified plant species; and Janet W. Reid, who reviewed the English text.

## References

01. Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP. Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis warning signals and mimicry. Oxford: Oxford University Press; 2004.
02. Trigo JR. The chemistry of antipredator defense by secondary compounds in Neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. J Braz Chem Soc. 2000; 11: 551-561.
03. Nishida R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. Annu Rev Entomol. 2002; 47: 57-92.
04. Opitz SEW, Müller C. Plant chemistry and insect sequestration. Chemoecology. 2009; 19: 117-154.
05. Trigo JR. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. Phytochem Rev. 2011; 10: 83-98.
06. Brower LP, Ryerson WN, Coppinger LL, Glazier SC. Ecological chemistry and the palatability spectrum. Science. 1968; 161: 1349-1350.
07. Ritland DB. Variation in palatability of queen butterflies (*Danaus gilippus*) and implications regarding mimicry. Ecology. 1994; 75: 732-746.
08. Bowers MD. Unpalatability as a defense strategy of *Euphydryas phaeton* (Nymphalidae). Evolution. 1980; 34: 586-600.
09. Bowers MD. Plant allelochemistry and mimicry. In: Barbosa P, Letourneau D, editors. Novel aspects of plant-insect interactions, New York: John Wiley; 1988. pp. 273-311.
10. Hay-Roe MM, Nation J. Spectrum of cyanide toxicity and allocation in *Heliconius erato* and *Passiflora* host plants. J Chem Ecol. 2007; 33: 319-329.
11. Silva KL, Trigo JR. Structure-activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. J Chem Ecol. 2002; 28: 637-648.

12. Hartmann T. Pyrrolizidine alkaloids: The successful adoption of a plant chemical defense. In: Conner WE, editor. Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae. New York: Oxford University Press; 2009. pp. 55-81.
13. Macel M. Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochem Rev.* 2011; 10: 75-82.
14. Eisner T, Meinwald J. The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 50-55.
15. Hartman T, Ober D. Defense by pyrrolizidine alkaloids: Developed by plants and recruited by insects. In: Schaller A, editor. Induced plant resistance to herbivory, Springer Science+Business Media BV, 2008. pp. 213-231.
16. Edgar JA, Boppré M, Kaufmann E. Insect-synthesized retronecine ester alkaloids: precursors of the common arctiine (Lepidoptera) pheromone hydroxydanaidal. *J Chem Ecol.* 2007; 33: 2266-2280.
17. Conner WE, Jordan AT. From armaments to ornaments: the relationship between chemical defense and sex in tiger moths. In: Conner WE, editor. Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae. New York: Oxford University Press; 2009. pp. 155-152.
18. Eisner T, Rossini C, González A, Iyengar VK, Seigler MVS, Smedley SR. Paternal investment in egg defense. In: Hilker M, Meiners T, editors. Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Berlin: Blackwell Verlag; 2002. pp. 91-116.
19. Conner WE, Iyengar VK. Male pheromones and courtship. In: Allison JD, Cardé RT, editors. Pheromone communication in moths: Evolution, behavior and application. California: University of California Press; 2015. In press.

20. Da Costa MA. Phylogeny of *Utetheisa* s. str. (Lepidoptera: Noctuidae: Arctinae) with comments on the evolution of colour, hind wing scales and origin of New World species. *Invert Syst.* 2010; 24: 113-130.
21. Sourakov A. You are what you eat: native versus exotic *Crotalaria* species (Fabaceae) as host plants of the Ornate Bella Moth, *Utetheisa ornatix* (Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae). *J Nat Hist.* 2015; 49: 2397-2415.
22. Polhill RM. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. Rotterdam: AA Balkema; 1982.
23. Eisner T. For love of nature: exploration and discovery at biological field stations. *BioScience* 1982; 32: 321-326.
24. Eisner T, Eisner M. Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid containing moth *Utetheisa ornatix*, and its larva. *Psyche.* 1991; 98: 111-118.
25. González A, Rossini C, Eisner M, Eisner T. Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatix*). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 5570-5574.
26. Ferro VG, Guimarães PR, Trigo JR. Why do larvae of *Utetheisa ornatix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomol Exp Appl.* 2006; 121: 23-29.
27. Hristov N, Conner WE. Effectiveness of tiger moth (Lepidoptera, Arctiidae) chemical defenses against an insectivorous bat (*Eptesicus fuscus*). *Chemoecology.* 2005; 15: 105-113.
28. Cogni R. Resistance to plant invasion? A native specialist herbivore shows preference for and higher fitness on an introduced host. *Biotropica.* 2010; 42: 188-193.
29. Flores AS, Tozzi AMGA, Trigo JR. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: chemotaxonomic significance. *Biochem Syst Ecol.* 2009; 37: 459-469.
30. Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. *Am Nat.* 1985; 125: 1-15.

31. Clutton-Brock TH, Harvey PH. Primate ecology and social organization. *J Zool.* 1977; 183: 1-39.
32. Agrawal AA, Fishbein M. Plant defense syndromes. *Ecology.* 2006; 87: S132-S149.
33. Agrawal AA, Salminen J-P, Fishbein M. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): evidence for escalation. *Evolution.* 2008; 63: 663-673.
34. Roque-Albelo L, Garrett SE, Conner WE. Darwin's moth: *Utetheisa* in the Galápagos Islands. In: Conner WE, editor. Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae. New York: Oxford University Press; 2009. pp. 207-222.
35. Roque-Albelo L, Landry B. Two new species of *Utetheisa* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae, Arctiinae) from the Galapagos Islands, Ecuador. *ZooKeys.* 2009; 21: 55-72.
36. le Roux, MM, Boatwright JS, van Wyk BE. A global infrageneric classification system for the genus *Crotalaria* (Leguminosae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon.* 2013; 62: 957-971.
37. Flores AS. Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) no Brasil. Dr. Sc. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. 2004. Available: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000343516>
38. Pando LA, Carvalho DD, Toyama MH, Ciero LD, Novello JC, Pascholatti SF, Marangoni S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. *Protein J.* 2004; 23: 437-444.
39. Pilbeam DJ, Bell EA. Free amino acids in *Crotalaria* seeds. *Phytochemistry.* 1979; 18: 973-985.
40. Gomes CEM, Barbosa AEAD, Macedo LLP, Pitanga JCM, Moura FT, Oliveira AS, Moura RM, Queiroz AFS, Macedo FP, Andrade LBS, Vidal MS, Sales MP. Effect of

- trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant Physiol Biochem.* 2005; 43: 1095-1102.
41. Guimarães PR, Raimundo LG, Bottcher C, Silva RR, Trigo JR. Extrafloral nectaries as a deterrent mechanism against seed predators in the chemically protected weed *Crotalaria pallida* (Leguminosae). *Austral Ecol.* 2006; 31: 776-782.
  42. Franco MS, Cogni R. Common-garden experiments reveal geographical variation in the interaction among *Crotalaria pallida* (Leguminosae: Papilionideae), *Utetheisa ornatix* L. (Lepidoptera: Arctiidae), and extrafloral nectary visiting ants. *Neotrop Entomol.* 2013; 42: 223-229.
  43. Pereira MF, Trigo JR. Ants have a negative rather than a positive effect on extrafloral nectaried *Crotalaria pallida* performance. *Acta Oecol.* 2013; 51: 49-53.
  44. Robinson MH, Mirick H. The predatory behavior of the golden-web spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae). *Psyche.* 1971; 78: 123-139.
  45. Travassos L. Contribuição ao conhecimento dos 'Arctiidae'. XI. Gênero "*Utetheisa*" Hübner, 1819. Verificação de "*U. pulchella*" (L., 1758) Kirby, 1892, no Nordeste do Brasil. *Rev Bras Biol.* 1946; 6: 343-354.
  46. Cogni R, Trigo JR, Futuyma D. A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatix*). *Mol Ecol.* 2012; 21: 6152-6162.
  47. Bogner FX. Interspecific advantage results in intraspecific disadvantage: Chemical protection versus cannibalism in *Utetheisa ornatix* (Lepidoptera: Arctiidae). *J Chem Ecol.* 1996; 22: 1439-1451.
  48. Vasconcellos-Neto J, Lewinsohn TM. Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. *Ecol Entomol.* 1984; 9: 337-344.

49. Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Barata LES. Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. J Chem Ecol. 1996; 19: 669-679.
50. Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Ernst L, Barata LES. Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). Biol J Linn Soc. 1996; 58: 99-123.
51. Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Ernst L, Singer MS, Bernays EA. Acquired and partially de novo synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. J Chem Ecol. 2004; 30: 229-254.
52. Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer MS, Bernays EA. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. Insect Biochem Mol Biol. 2005; 35: 391-411.
53. Craig JC, Puroshothaman KK. An improved preparation of tertiary amine *N*-oxides. J Org Chem. 1970; 35: 1721-1722.
54. Avise JC. Evolutionary pathways in nature. A phylogenetic approach. New York: Cambridge University Press; 2006.
55. Doyle JJ Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 1987; 19: 11-15.
56. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand MA, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols. New York: Academic Press; 1990. pp. 315-322.
57. Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Theor Appl Genet. 1994; 89: 26-32.

58. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1792-1797.
59. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
60. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012; 29: 1969-1973.
61. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007; 7: 214.
62. Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. Tracer v1.6. 2014; Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
63. Crawley MJ. *The R book*, 2nd edition. Chichester: Wiley.
64. R Development Core Team (2012) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
65. Gotelli NJ, Ellison AM. *A primer of ecological statistics*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
66. Dussourd DE, Ubik K, Harvis C, Resch J, Meinwald J, Eisner T. Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 5992-5996.
67. Hoina A, Martins CHZ, Trigo JR, Cogni R. Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. *Arthropod Plant Interact.* 2013; 7: 169-175.
68. Malcolm SB. Milkweeds, monarch butterflies and the ecological significance of cardenolides. *Chemoecology.* 1994/1995; 3/4/5/6: 101-117.

69. Conner WE, Eisner T, Vander Meer RK, Guerrero A, Meinwald J. Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): Role of a pheromone derived from dietary alkaloids. *Behav Ecol Sociobiol.* 1981; 9: 227-235.
70. Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays EA. Phenological fate of plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Chemoecology.* 2004; 14: 207-216.
71. Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays EA, Singer MS. Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005; 35: 1083-1099.

Table 1. Species of *Crotalaria* used to feed larvae of *Utetheisa ornatrix* for *Nephila clavipes* bioassay and PA analysis.

Species	Section	Native range
<i>C. incana</i> L.	<i>Chrysocalycinae</i>	Pantropical (uncertain origin) <sup>2</sup>
<i>C. juncea</i> L.	<i>Calycinae</i>	India, Asia <sup>2</sup>
<i>C. micans</i> Link	<i>Chrysocalycinae</i>	Neotropics <sup>1,2</sup>
<i>C. ochroleuca</i> G. Don	<i>Hedriocarpae</i>	Tropical Africa <sup>2</sup>
<i>C. pallida</i> Aiton	<i>Hedriocarpae</i>	Pantropical (uncertain origin) <sup>2</sup>
<i>C. paulina</i> Schrank	<i>Calycinae</i>	Neotropics <sup>1,2</sup>
<i>C. spectabilis</i> Roth	<i>Crotalaria</i>	Asia <sup>2</sup>
<i>C. vitellina</i> Ker Gawler	<i>Chrysocalycinae</i>	Neotropics <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Flores [38]; <sup>2</sup>Polhill [22]

Table 2. Mass fragmentation pattern of pyrrolizidine alkaloids found in *Crotalaria* species and in adults of *Utetheisa ornatrix* fed on these host plants. The analyses were carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in electron impact mode and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in electrospray ionization mode.

Pyrrolizidine alkaloids	RI <sup>a</sup>	Rt <sup>b</sup>	Diagnostic ions for GC-MS (above) <sup>c</sup> and LC-MS (below) <sup>d</sup> m/z (%)	Reference for GC-MS <sup>e</sup>
Retronecine	1487	6.085	[M] <sup>+</sup> 155 (23), 111 (60), 94 (17), 80 (100) [2M+H] <sup>+</sup> 343 (9), [M+H] <sup>+</sup> 172 (100)	[29] <sup>1</sup>
9-(2'-Hydroxy)-ethanoylretronecine-like	1795	nd	[M] <sup>+</sup> 227 (2), 183 (6), 138 (62), 120 (6), 93 (100), 80 (40)	[29] <sup>1</sup>
9-(2-Hydroxy-3-methylpentanoyl)- trachelanthamidine	1831	nd	[M] <sup>+</sup> 255 (2), 142 (6), 125 (10), 124 (100), 96 (4), 83 (20), 82 (12)	[52] <sup>1</sup>
Creatonotine B-like	1840	nd	[M] <sup>+</sup> 255 (3), 211 (7), 138 (99), 124 (13), 120 (11), 94 (40), 93 (100), 80 (25)	[51] <sup>2</sup>
7-Senecieryl retronecine-like	1861	nd	[M] <sup>+</sup> 237 (5), 137 (29), 136 (18), 94 (25), 93 (10), 80 (100)	[29] <sup>1</sup>
9-Senecieryl retronecine-like	1890	nd	[M] <sup>+</sup> 237 (3), 193 (9), 154 (15), 138 (27), 137 (28), 136 (20), 94 (24), 93 (100), 80 (20)	[29] <sup>1</sup>
Iso-creatonotine B	2024	22.075	[M] <sup>+</sup> 269 (3), 251 (10), 138 (40), 124 (17), 120 (26), 111 (61), 106 (51), 94 (26), 80 (100) [M+Na] <sup>+</sup> 308 (11), 286 [M+H] <sup>+</sup> 286 (100)	[51] <sup>1</sup>
7-Octanoyl retronecine-like	2031	nd	[M] <sup>+</sup> 281 (50), 220 (19), 154 (8), 136 (22), 124 (22), 111 (69), 106 (47), 94 (24), 80 (100)	[29] <sup>1</sup>

Pyrrolizidine alkaloids	RI <sup>a</sup>	Rt <sup>b</sup>	Diagnostic ions for GC-MS (above) <sup>c</sup> and LC-MS (below) <sup>d</sup> m/z (%)	Reference for GC-MS <sup>e</sup>
Cretonotine B	2048	22.969	[M] <sup>+</sup> 269 (<1), 251 (1), 225 (5), 138 (100), 93 (88), 80 (18) [M+Na] <sup>+</sup> 308 (6), 286 [M+H] <sup>+</sup> 286 (100)	[51] <sup>1</sup>
9-Octanoyl retronecine-like	2052	nd	[M] <sup>+</sup> 281 (5), 236 (6), 138 (62), 120 (26), 106 (13), 94 (47), 93 (100), 80 (44)	[29] <sup>2</sup>
1,2-Dihydrocretonotine B	2064	nd	[M] <sup>+</sup> 271 (4), 210 (12), 171 (20), 140 (25), 139 (11), 114 (10), 96 (34), 95 (70), 82 (100)	[52] <sup>1</sup>
9-(5'-Hydroxy)-heptanoylretronecine-like	2082	24.162	[M] <sup>+</sup> 283 (1), 224 (4), 155 (24), 138 (65), 93 (100), 80 (19) [M+Na] <sup>+</sup> 322 (14), [M+H] <sup>+</sup> 300 (100)	[29] <sup>1</sup>
Crispatine-like	2175	22.598	[M] <sup>+</sup> 309 (2), 222 (7), 136 (88), 120 (83), 119 (100), 93 (62), 80 (29) [M+Na] <sup>+</sup> 348 (11), [M+H] <sup>+</sup> 326 (100)	[29] <sup>3</sup>
Unknown monocrotaline-type	2243	24.936	[M] <sup>+</sup> 323 (3), 236 (4), 208 (10), 136 (97), 120 (87), 119 (100), 93 (54), 80 (27) [M+Na] <sup>+</sup> 362 (9), [M+H] <sup>+</sup> 340 (100)	[29] <sup>3</sup>
Incanine-like	2315	27.280	[M] <sup>+</sup> 337 (6), 264 (11), 250 (5), 222 (8), 136 (100), 120 (76), 119 (79), 93 (49), 80 (27) [M+Na] <sup>+</sup> 376 (15), [M+H] <sup>+</sup> 354 (100)	[29] <sup>1</sup>
Monocrotaline	2336	18.610	[M] <sup>+</sup> 325 (1), 254 (3), 236 (46), 136 (52), 120 (100), 93 (38), 80 (19) [M+Na] <sup>+</sup> 364 (6), [M+H] <sup>+</sup> 342 (100)	[29] <sup>1</sup>
Sencionine / Integerrimine	2339/ 2410	26.789/ 25.111	[M] <sup>+</sup> 335 (6), 291 (12), 248 (12), 220 (21), 136 (97), 120 (100), 93 (83), 80 (34) [M+Na] <sup>+</sup> 374 (13), [M+H] <sup>+</sup> 352 (100)	[29] <sup>1</sup>

Pyrrolizidine alkaloids	RI <sup>a</sup>	Rt <sup>b</sup>	Diagnostic ions for GC-MS (above) <sup>c</sup> and LC-MS (below) <sup>d</sup> m/z (%)	Reference for GC-MS <sup>e</sup>
Trichodesmine-like	2341/ 2348	25.326	[M] <sup>+</sup> 353 (6), 264 (100), 136 (31), 120 (35), 93 (44), 80 (14) [M+Na] <sup>+</sup> 392 (17), [M+H] <sup>+</sup> 370 (100)	[29] <sup>1</sup>
Unknown monocrotaline-type	2346	26.050	[M] <sup>+</sup> 337 (2), 222 (5), 136 (58), 120 (89), 119 (100), 93 (40), 80 (18) [M+Na] <sup>+</sup> 376 (20), [M+H] <sup>+</sup> 354 (100)	[29] <sup>3</sup>
Unknown monocrotaline-type	2346	nd	[M] <sup>+</sup> 353 (2), 264 (45), 136 (75), 120 (100), 119 (95), 93 (70), 80 (25)	[29] <sup>2</sup>
Senecionine-like	2376	nd	[M] <sup>+</sup> 337 (6), 222 (18), 136 (75), 120 (100), 93 (67), 80 (32), 55 (47)	[29] <sup>2</sup>
Methylmonocrotaline-like	2384	nd	[M] <sup>+</sup> 339 (1), 250 (58), 136 (53), 120 (100), 93 (39), 80 (20)	[29] <sup>1</sup>
Senecionine-like	2386	nd	[M] <sup>+</sup> 321 (13), 247 (7), 136 (98), 120 (100), 119 (74), 93 (76), 80 (37)	[29] <sup>1</sup>
Trichodesmine-like	2418	23.415	[M] <sup>+</sup> 351 (2), 264 (60), 136 (47), 120 (100), 93 (35), 80 (18) 392 [(M+Na) <sup>+</sup> , 13], 370 [(M+H) <sup>+</sup> , 100]	[29] <sup>1</sup>
Incanine-like	2430	nd	[M] <sup>+</sup> 337 (5), 264 (27), 222 (20), 136 (62), 120 (100), 93 (65), 80 (27)	[29] <sup>1</sup>
Trichodesmine-like	2437	nd	[M] <sup>+</sup> 353 (2), 338 (4), 264 (83), 222 (8), 136 (58), 120 (100), 93 (34), 80 (18)	[29] <sup>1</sup>
Senecionine-like	2540	nd	[M] <sup>+</sup> 337 (1), 155 (12), 138 (71), 136 (28), 93 (100), 80 (19), 55 (27)	[29] <sup>2</sup>
Senecionine-like	2551	nd	[M] <sup>+</sup> 351 (31), 220 (10), 136 (43), 120 (100), 119 (90), 93 (75), 80 (33)	[29] <sup>2</sup>
Platyphorine C-like	2556	25.260	[M] <sup>+</sup> 383 (2), 281 (13), 267 (11), 252 (100), 138 (24), 136 (27), 120 (51), 93 (51), 80 (18) [M+Na] <sup>+</sup> 422 (19), [M+H] <sup>+</sup> 400 (100)	[52] <sup>1</sup>

Pyrrolizidine alkaloids	RI <sup>a</sup>	Rt <sup>b</sup>	Diagnostic ions for GC-MS (above) <sup>c</sup> and LC-MS (below) <sup>d</sup> m/z (%)	Reference for GC-MS <sup>e</sup>
Unknown <i>seco</i> -PA	2615	nd	[M] <sup>+</sup> 365 (20), 321 (15), 276 (22), 238 (100), 168 (70), 122 (38), 110 (32), 94 (31), 83 (46)	[29] <sup>1</sup>
Retrorsine/Usaramine	2621/ 2647	22.989/ 22.731	[M] <sup>+</sup> 351 (7), 246 (5), 136 (100), 120 (99), 119 (84), 93 (80), 80 (35) [M+Na] <sup>+</sup> 390 (7), [M+H] <sup>+</sup> 368 (100)	[29] <sup>1</sup>
Senecionine-like	2675	nd	[M] <sup>+</sup> 351 (3), 224 (8), 143 (100), 136 (65), 120 (86), 119 (67), 93 (51), 80 (20)	[29] <sup>2</sup>
Senecionine-like	2684	nd	[M] <sup>+</sup> 351 (2), 143 (24), 136 (51), 120 (100), 119 (91), 93 (79), 80 (23)	[29] <sup>2</sup>
Unknown <i>seco</i> -PA	2728	nd	[M] <sup>+</sup> 381 (25), 338 (55), 320 (63), 250 (58), 238 (77), 168 (100), 150 (32), 122 (52), 110 (44)	[29] <sup>1</sup>
Unknown <i>seco</i> -PA	2815	nd	[M] <sup>+</sup> 379 (43), 334 (26), 238 (22), 168 (74), 151 (29), 139 (57), 122 (100), 110 (62), 94 (57)	[29] <sup>1</sup>
Unknown <i>seco</i> -PA	2866	nd	[M] <sup>+</sup> 421 (31), 376 (22), 168 (77), 150 (79), 139 (67), 122 (100), 110 (64), 94 (45), 43 (96)	[29] <sup>1</sup>
Unknown <i>seco</i> -PA	2907	nd	[M] <sup>+</sup> 437 (34), 250 (79), 226 (41), 197 (78), 183 (78), 168 (44), 122 (100), 110 (52), 94 (52)	[29] <sup>1</sup>

<sup>a</sup>. Retention index in GC-MS analyses.

<sup>b</sup>. Retention time (min) in LC-MS analyses. Some compounds detected by GC-MS were not detected (nd) by LC-MS.

<sup>c</sup>. in free base form.

<sup>d</sup>. in *N*-oxide form.

<sup>e</sup>. <sup>1</sup>Mass spectra matching with literature, <sup>2</sup>Interpretation of the mass spectrum from literature, <sup>3</sup>Erroneously described in 29 as unknown senecionine-type.

Table 3. Relative abundance (%) of pyrrolizidine alkaloids in adults of *Utetheisa ornatrix* (male: M, female: F) and the species of *Crotalaria* used as larval host plants (HP). Five individuals were used for GC-MS analysis. Only seeds and individuals from seeds were analyzed. The data are shown as mean  $\pm$  standard error.

Pyrrolizidine alkaloids	RI	<i>C. micans</i>			<i>C. paulina</i>			<i>C. vitellina</i>			<i>C. juncea</i>			<i>C. ochroleuca</i>			<i>C. spectabilis</i>			<i>C. incana</i>			<i>C. pallida</i>		
		M	F	HP	M	F	HP	M	F	HP	M	F	HP	M	F	HP	M	F	HP	M	F	HP	M	F	HP
Retronecine	1487	19 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	21 $\pm$ 6	-	2 $\pm$ 1	-	26 $\pm$ 2	32 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	-	2 $\pm$ 1	-	6 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	-	-	-	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1		13 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	-
9-(2'-Hydroxy)-ethanoyl retronecine-like	1795	-	-	-	-	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	-	-	-	9 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-(2'-Hydroxy-3'- methylpentanoyl)- trachelanthamidine	1831	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 $\pm$ 1	-	-	2 $\pm$ 1	-	-
Creatonotone B-like	1840	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 $\pm$ 1	-
7-Senecieryl retronecine-like	1861	-	-	3 $\pm$ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 $\pm$ 1	-	-	-	-	-	2 $\pm$ 1	-	-	-
9-Senecieryl retronecine-like	1890	-	-	10 $\pm$ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 $\pm$ 1	-	-	-	-	-	3 $\pm$ 1	-	-	-
Iso-creatonotone B	2024	9 $\pm$ 1	13 $\pm$ 3	-	-	-	-	9 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	-	-	-	-	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	-	-	1 $\pm$ 1	-	-	1 $\pm$ 1	-	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	-
7-Octanoyl retronecine-like	2031	-	-	-	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	-	-	-	-	6 $\pm$ 1	11 $\pm$ 4	13 $\pm$ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatonotone B	2048	42 $\pm$ 4	38 $\pm$ 5	-	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	-	61 $\pm$ 2	56 $\pm$ 3	-	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	-	8 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	-	-	4 $\pm$ 1	-	6 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	-	20 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	-





Table 4. Logistic regression results for the *Nephila clavipes* response (predation or release) in relation to the concentration of pyrrolizidine alkaloids in adults of *Utetheisa ornatix* fed as larvae on leaves or unripe seeds of eight host plants.

Host plant	Equation	$\chi^2$	P <sup>a</sup>
<i>C. micans</i>	Logit P <sub>i</sub> = -2.655 + (1.641 X <sub>i</sub> )	29.279	< 0.001
<i>C. paulina</i>	Not calculated: all individuals were released	-	-
<i>C. vitellina</i>	Logit P <sub>i</sub> = 3.696 - (0.020 X <sub>i</sub> )	0.006	0.940
<i>C. ochroleuca</i>	Logit P <sub>i</sub> = -2.547 + (1.772 X <sub>i</sub> )	40.464	< 0.001
<i>C. juncea</i>	Logit P <sub>i</sub> = 0.526 + (0.887 X <sub>i</sub> )	5.384	0.020
<i>C. spectabilis</i>	Not calculated: only 1 of 37 individuals was preyed	-	-
<i>C. incana</i>	Logit P <sub>i</sub> = -1.586 + (1.040 X <sub>i</sub> )	21.594	< 0.001
<i>C. pallida</i>	Logit P <sub>i</sub> = -0.646 + (1.779 X <sub>i</sub> )	13.585	< 0.001
All species pooled together	Logit P <sub>i</sub> = -0.751 + (0.890 X <sub>i</sub> )	129.535	< 0.001

<sup>a</sup>The likelihood ratio test



Fig. 1. Female of *Nephila clavipes* handling an adult male of *Utetheisa ornatrix*. Note that the spider touches the moth with her pedipalps, probably evaluating the content of defensive pyrrolizidine alkaloids.

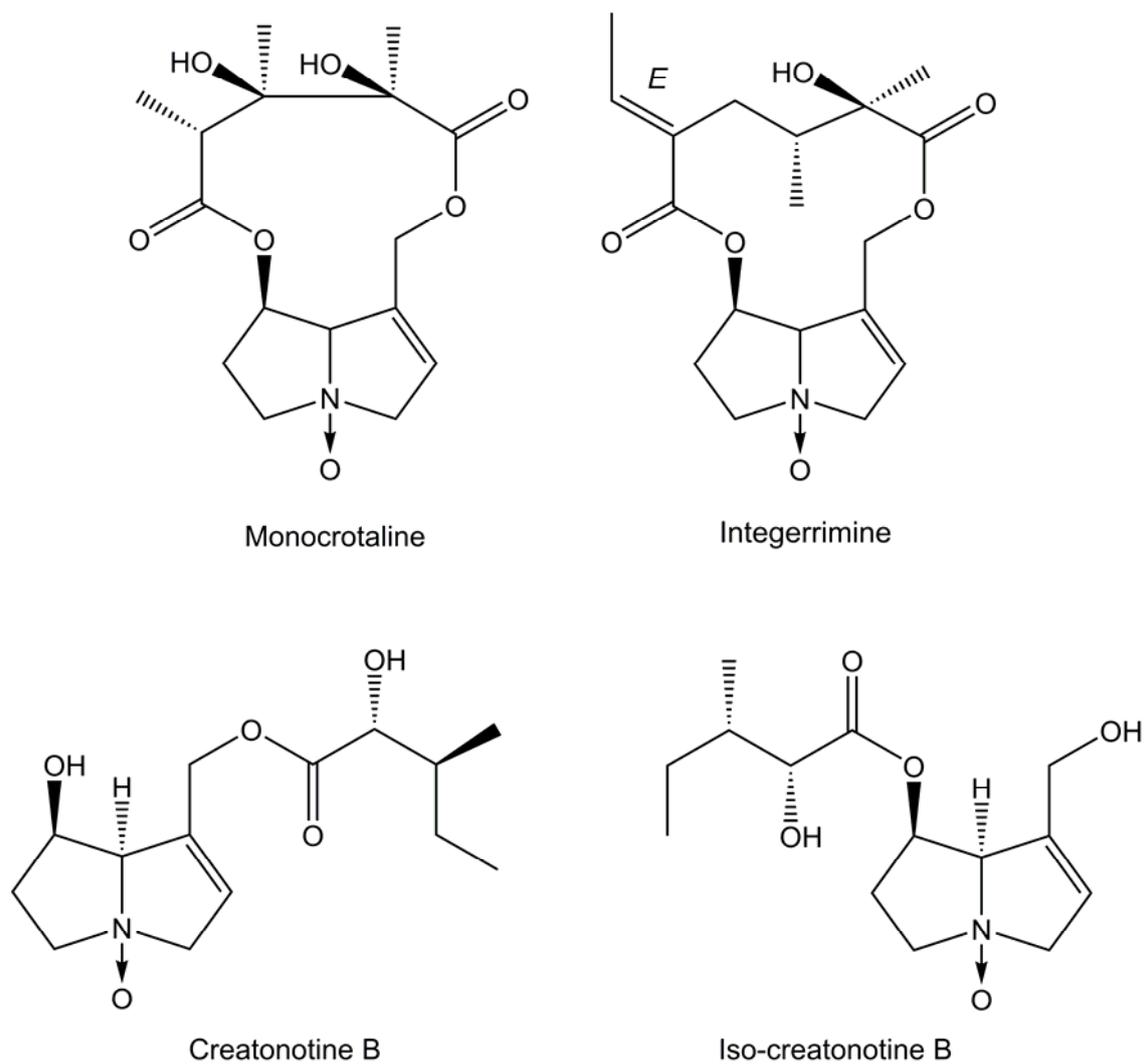


Fig. 2. Some pyrrolizidine alkaloids found in this study. The alkaloids are drawn in their *N*-oxide form. For more structures, see, e.g., Flores et al. [29].

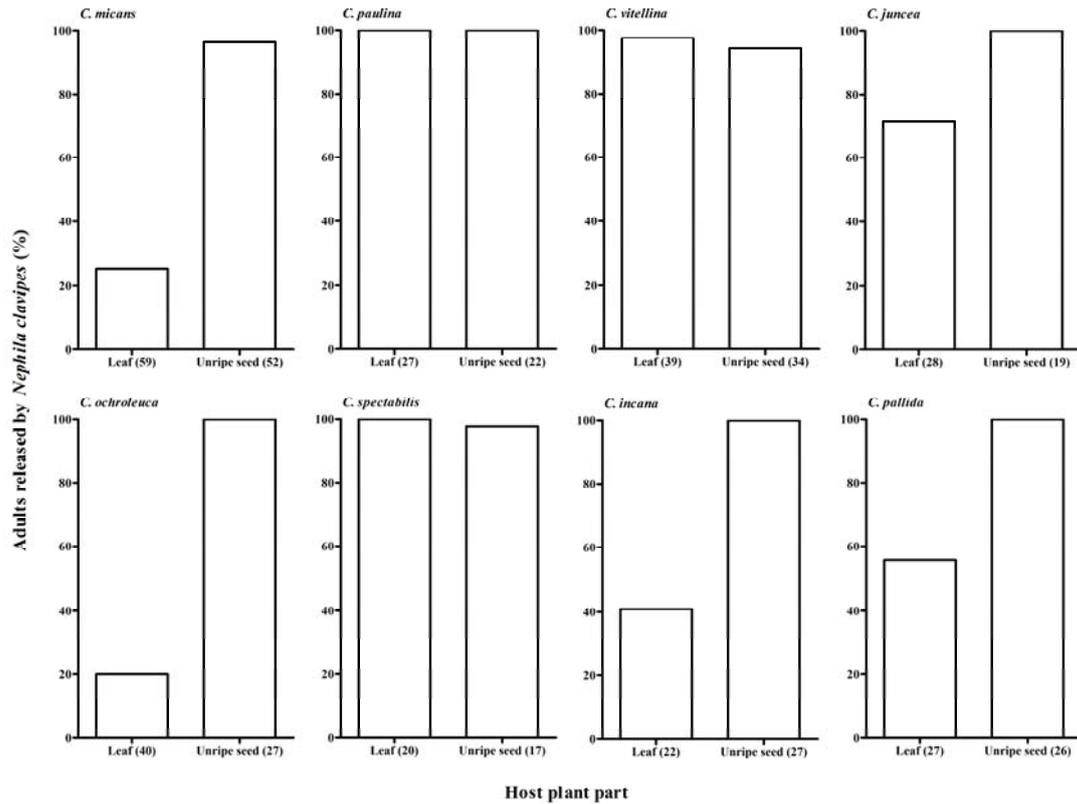


Fig. 3. Percentage of adults of *Utetheisa ornatrix* released by *Nephila clavipes* with respect to eight host-plant species and plant parts (leaf or unripe seed) fed to the larvae. The natives *Crotalaria micans*, *C. paulina*, and *C. vitellina*, non-natives *C. juncea*, *C. ochroleuca*, and *C. spectabilis*, and species of uncertain origin *C. incana* and *C. pallida*. Numbers in parentheses in "plant part" represent the number of adults bioassayed for each diet.

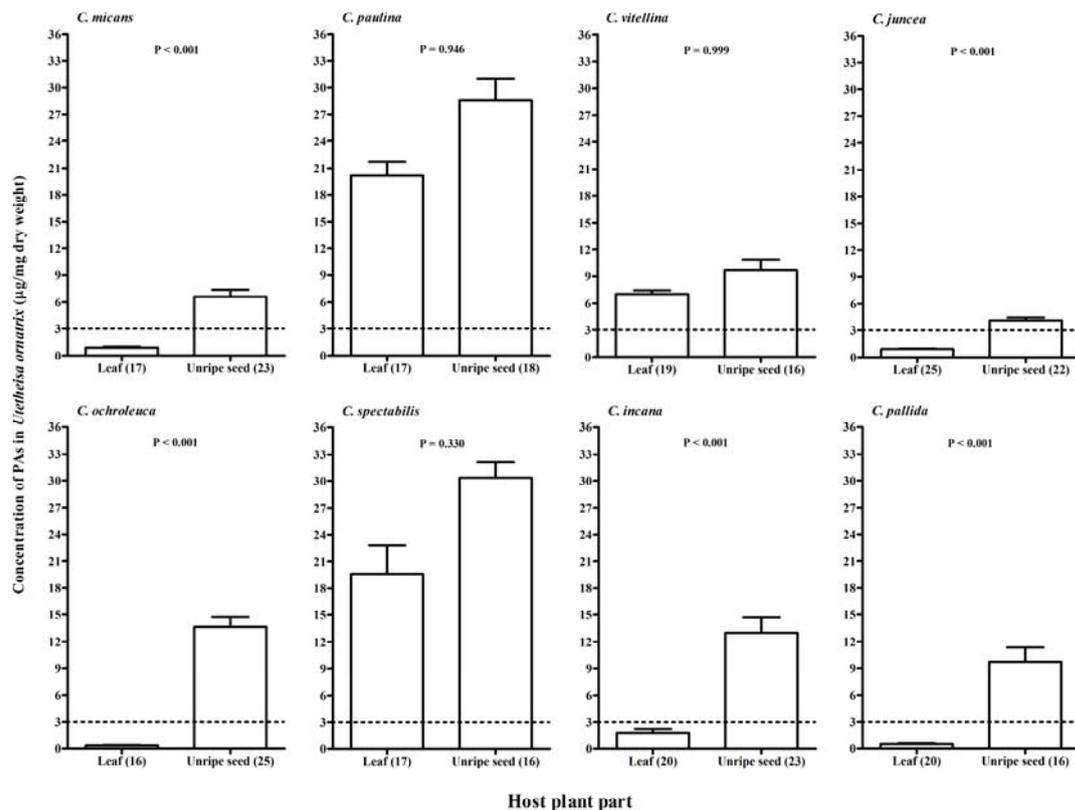


Fig. 4. Concentration of pyrrolizidine alkaloids (mean  $\pm$  se) in adults of *Utetheisa ornatrix* with respect to eight host-plant species and plant parts (leaves or unripe seeds) fed to the larvae. Numbers in parentheses in "plant part" represent the number of adults analyzed for each diet. The dotted line is the concentration at which baits treated with monocrotaline and integerrimine in the *N*-oxide form (3.0  $\mu$ g/mg) were 100% released by *Nephila clavipes*. The probability that the PA concentration in adults fed as larvae on leaves or seeds, for each host plant, is significantly different is given above the bars (*post hoc* Tukey test). For other statistics, see Results.

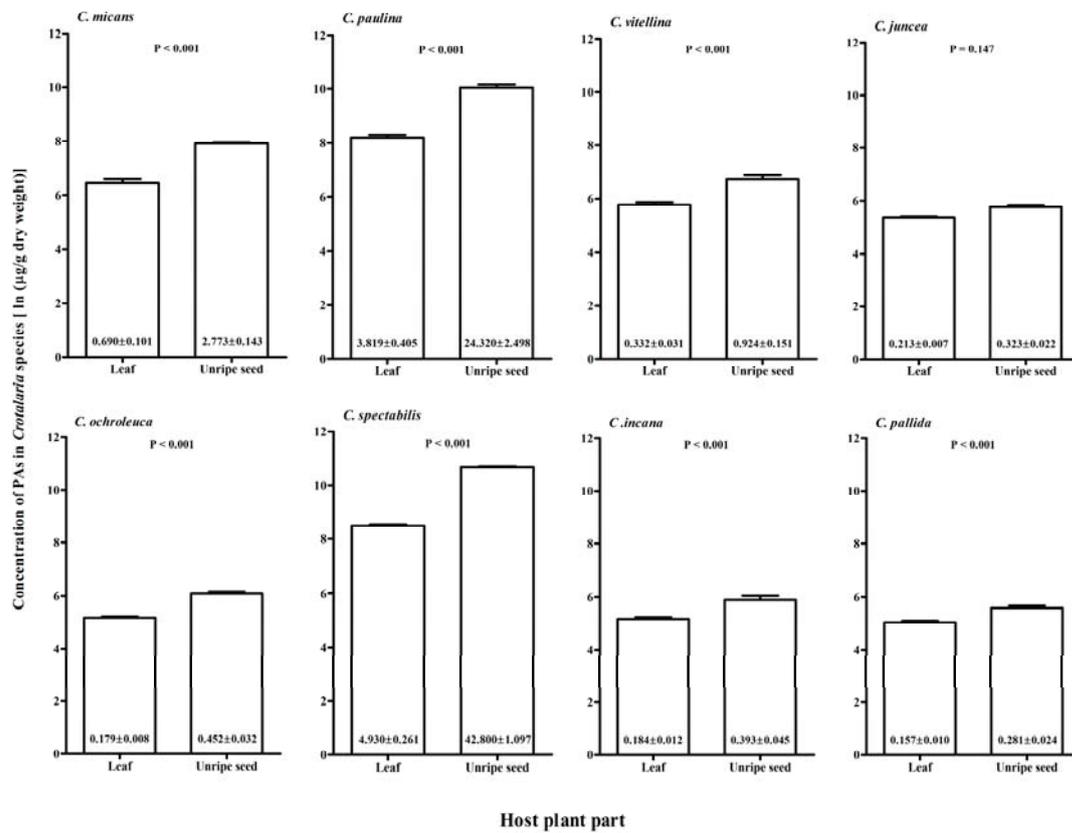


Fig. 5. Concentration of pyrrolizidine alkaloids (mean  $\pm$  se) in leaves and unripe seeds of *Crotalaria* species, which were used to rear *Utetheisa ornatrix* larvae. The concentration is given in ln transformed data ( $\mu\text{g/g}$  dry weight). The numbers inside the bars represent the mean  $\pm$  SE of untransformed data in  $\mu\text{g/mg}$  dry weight. The probability that the PA concentration in leaves and seeds, for each host plant, is significantly different is given above the bars (*post hoc* Tukey test).

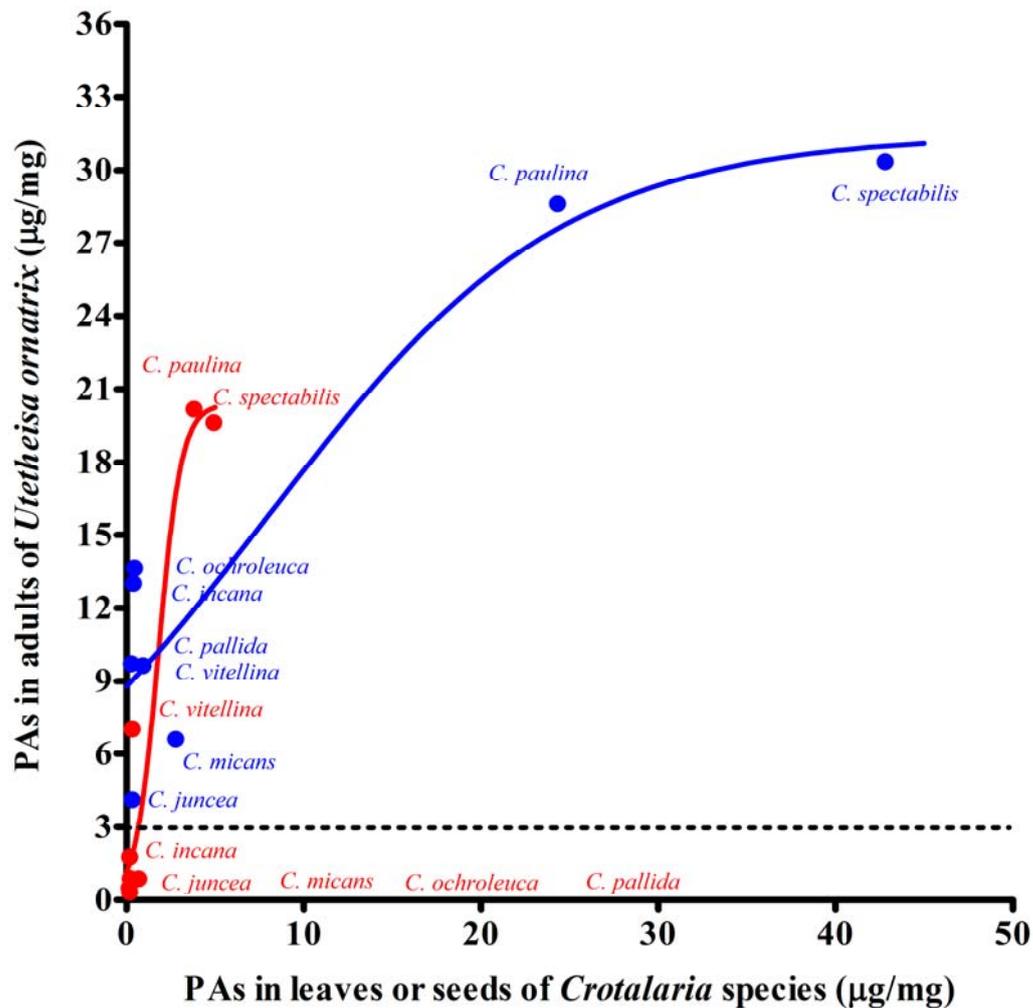


Fig. 6. Non-linear relationship between the mean of pyrrolizidine alkaloid concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  dry weight) in *Crotalaria* species and in adults of *Utetheisa ornatrix*. Red symbols are leaves and blue are seeds. The dotted line is the concentration at which baits treated with monocrotaline and integerrimine in the *N*-oxide form ( $3.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) were 100% released by *Nephila clavipes*.

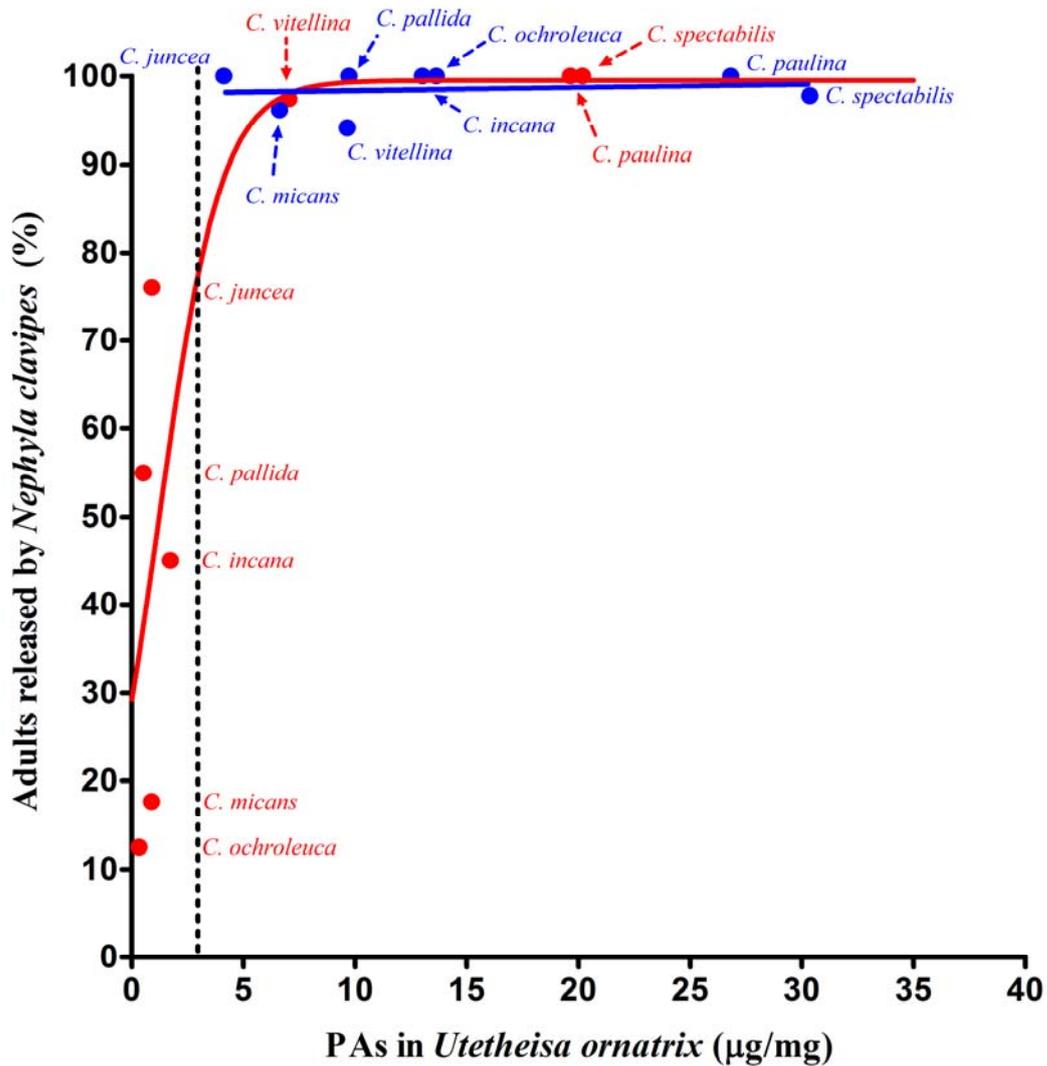


Fig. 7. Non-linear relationship between the mean of pyrrolizidine alkaloid concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  dry weight) in adults of *Utetheisa ornatrix* fed on leaves of different *Crotalaria* species and the percentage of these adults released by *Nephila clavipes*. Red symbols stand for larvae fed on leaves and blue symbols stand for larvae fed on seeds. The dotted line is the concentration at which baits treated with monocrotaline and integerrimine in the *N*-oxide form ( $3.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) were 100% released by *Nephila clavipes*.

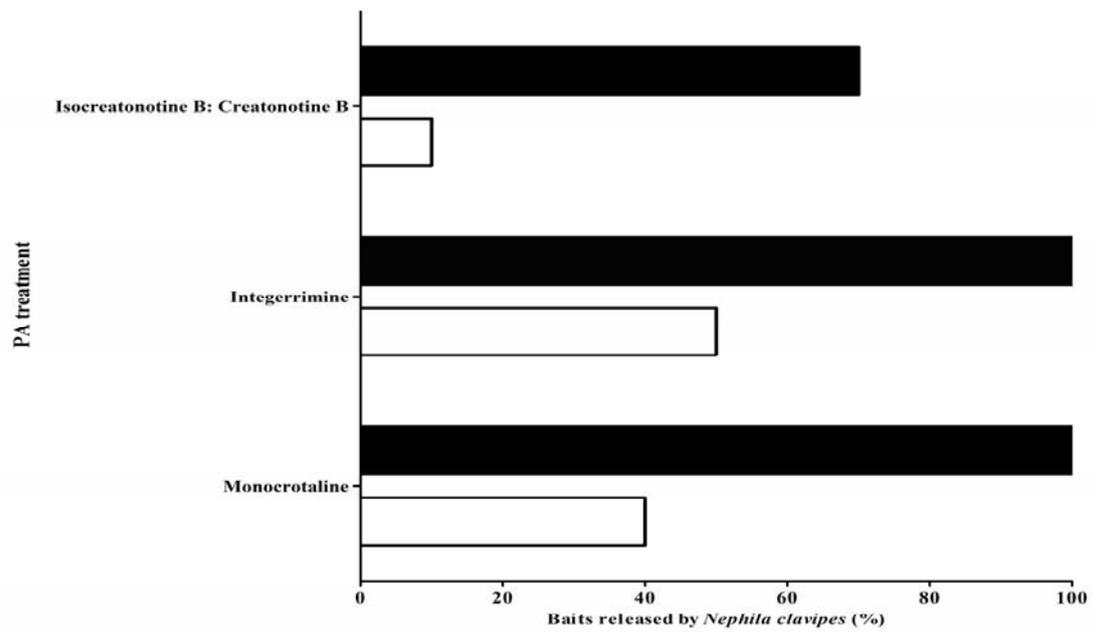


Fig. 8. Percentage of baits treated with different PA *N*-oxides, which were released by the spider *Nephila clavipes*. In black, the concentration of PAs was 3.0 µg/mg; in white 0.3 µg/mg.

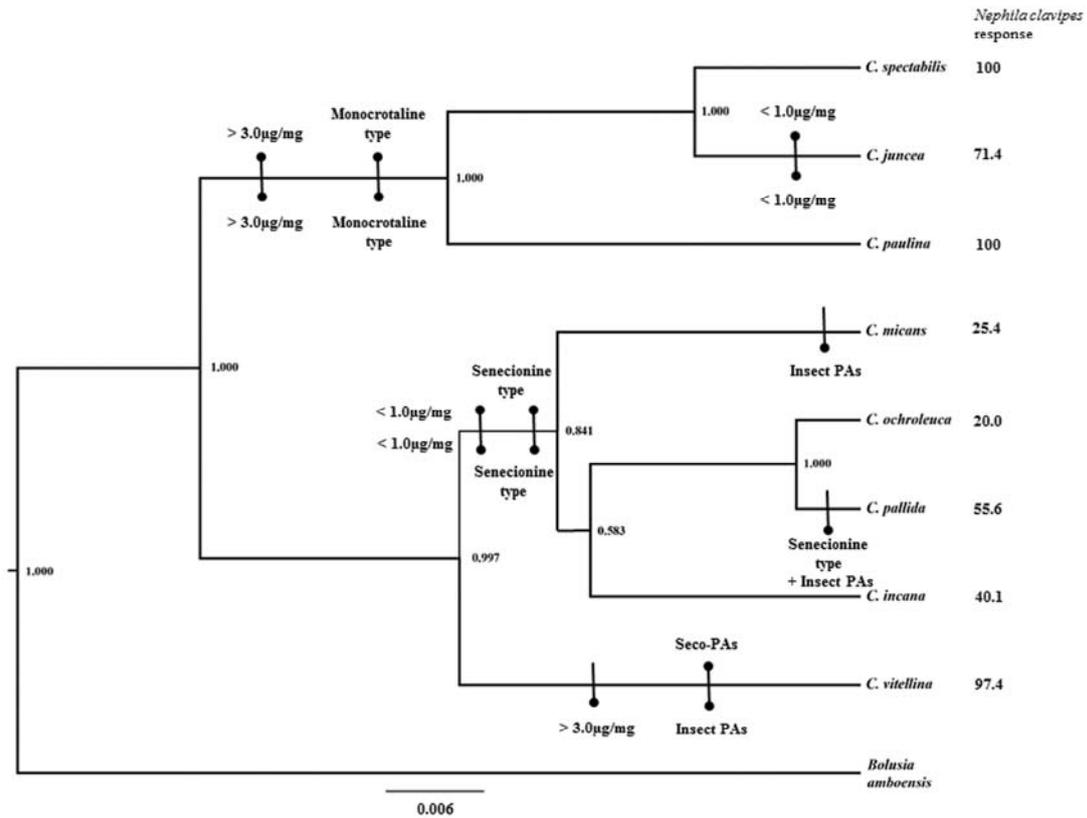


Fig. 9. Bayesian inference topology for eight species of *Crotalaria* based on ITS sequences onto which are mapped the amount and type of PAs in leaves of the *Crotalaria* host plants (above) and in adults of *Utetheisa ornatrix* whose larvae fed on these plants (below). Response of the spider *Nephila clavipes* in relation to adults of *Utetheisa ornatrix* is given beside each *Crotalaria* species. Numbers in each node indicate Bayesian posterior probabilities. The scale below the tree indicates the mean number of substitutions per site.



## CAPÍTULO 2

### **Como diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos afetam o desempenho e a defesa química de larvas e adultos da mariposa Neotropical especialista *Utetheisa ornatrix* (Arctiinae: Erebidae)?**

#### **RESUMO**

Larvas da mariposa neotropical especialista *Utetheisa ornatrix* (Arctiinae) alimentam-se de folhas e sementes de diferentes espécies de *Crotalaria* (Fabaceae), que produzem alcaloides pirrolizidínicos (APs), sequestrando esses compostos que são retidos durante toda a metamorfose protegendo quimicamente todos os estágios de vida da mariposa contra diversos predadores e são utilizados na comunicação sexual e reprodução. Nós utilizamos diferentes classes estruturais de APs incorporados em dieta artificial em diferentes concentrações e em concentrações molares equivalentes para investigarmos a capacidade metabólica e bioquímica de *U. ornatrix* em lidar com estes compostos e o impacto do sequestro dessas substâncias no desempenho da mesma, assim como o papel na defesa química contra predadores e na comunicação sexual dos adultos. Nós combinamos uma detalhada análise química da concentração e do perfil qualitativo dos APs sequestrados nos diferentes estágios de desenvolvimento de *U. ornatrix* com medidas de parâmetros de desempenho larval e de adultos, bem como bioensaios de predação em campo e laboratório com predadores vertebrados e invertebrados. Nós verificamos que o tipo de alcaloide na dieta e a concentração afeta o sequestro desses compostos por *U. ornatrix* e que dependendo da estrutura do AP, ele é sequestrado pela larva e transmitido sem alterações até a fase adulta e parte é utilizado na biossíntese do feromônio sexual de machos Hidroxidanaidal, ou sofre uma

série de transformações bioquímicas originando “insect PAs”, formados pela esterificação de um ácido néxico do próprio inseto com o AP adquirido da dieta. Parte destes alcaloides é utilizada diretamente como precursores comuns do hidroxidanaidal. Esta plasticidade bioquímica e metabólica de *U. ornatrix* não afeta nenhum dos parâmetros de desempenho de larvas e adultos. Quando estes AP foram incorporados em dieta em concentrações equimolares, o único parâmetro afetado é o tempo de desenvolvimento larval. Nós mostramos que pode existir uma relação entre os custos em termos de desempenho associado ao sequestro de diferentes APs e a eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatrix* em lidar com estes compostos. Podemos observar que larvas e adultos de *U. ornatrix* são protegidos pela aquisição de APs contra diferentes predadores e que essa defesa química é influenciada pelo tipo estrutural e concentração de AP na dieta, bem como a espécie de predador. Nós mostramos a importância funcional de “insect PAs” na defesa química contra predação.

**Palavras-chave:** *Crotalaria*, “insect PAs”, hidroxidanaidal, desempenho, monocrotalina, predação.

## INTRODUÇÃO

Para se proteger do ataque de inimigos naturais as plantas desenvolveram uma série de estratégias, que envolvem defesas físicas como a proteção mecânica por espinhos e tricomas não glandulares e defesas químicas como compostos secundários (Karban & Agrawal, 2002). Por outro lado, insetos herbívoros necessitam de suas plantas hospedeiras para atender os requisitos necessários para o metabolismo e crescimento adequado. Muitos dos aspectos de vida de um inseto, tais como comportamento, fisiologia, bioquímica e ecologia, estão relacionados de algum modo com o alimento que consomem (Waldbauer & Friedman 1991). A quantidade, a qualidade e a proporção de nutrientes presentes na planta, assim como a presença de compostos secundários podem afetar de diferentes modos a biologia de um inseto herbívoro e a interação com predadores. Embora vários insetos herbívoros possuam a capacidade de explorar compostos químicos defensivos de plantas em seu próprio benefício, pode ocorrer um custo energético para a detoxificação e aquisição destes compostos (Després et al. 2007), levando a consequências ecológicas e evolutivas na interação entre planta, insetos e seus inimigos naturais (Nishida 2002). Vários estudos têm demonstrado que o sequestro de compostos químicos defensivos da planta torna os herbívoros impalatáveis para diversos predadores como aranhas, formigas, aves e mamíferos, fornecendo proteção contra predação (Optiz & Müller 2009).

Dentre as defesas químicas de plantas, os alcaloides pirrolizidínicos (daqui por diante APs, Figura 1) representam uma classe de compostos secundários expressos constitutivamente que são tóxicos e/ou deterrentes para um grande número de insetos e vertebrados (Stegelmeier et al. 1999, Macel 2011, Trigo 2011). APs são ésteres de uma base necina (anel pirrolizidínico) com diferentes ácidos nécicos totalizando cerca de 360 estruturas e podem ocorrer na forma de base livre e *N*-óxido (Hartmann 1999). Em vertebrados, o mecanismo

de ação desses compostos está bem elucidado (revisão em Edgar et al. 2015). Uma vez ingeridos, APs base livre são absorvidos por difusão e APs *N*-óxido são rapidamente reduzidos no intestino na sua respectiva base livre. Essa forma do alcaloide é facilmente reabsorvida e bioativada por enzimas monooxigenases do citocromo P450 presentes no fígado (Huan et al. 1998). O processo de bioativação resulta na formação de ésteres pirrólicos tóxicos altamente reativos que se ligam facilmente a grupos tióis nucleofílicos de proteínas e grupos amino do DNA (Chen et al. 2010) capazes de induzir toxicidade aguda, causando uma severa hepatotoxicidade, ou toxicidade crônica, ocasionando genotoxicidade e tumorigenicidade (Fu et al. 2004). Em insetos, o mecanismo de bioativação de APs é comparado ao de vertebrados, uma vez que os mesmos também possuem uma grande diversidade de famílias de enzimas do citocromo P450 (Glendinning 2002). As evidências da atividade de APs em insetos foram baseadas no efeito mutagênico e citotóxico observado em *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) (Frei et al. 2002) e toxicidade aguda e crônica durante o desenvolvimento larval de *Philosamia ricini* (Saturniidae) (Narberhaus et al. 2005). No entanto, a atividade biológica destes alcaloides está relacionada com suas características estruturais (Culvenor et al. 1976, Mattocks 1986, Domínguez et al. 2008). Somente APs 1,2 insaturados com pelo menos um grupo hidroxila esterificado tornam-se tóxicos pelo processo de bioativação (Culvenor et al. 1976, Winter & Segall 1989). Bases necinas 1,2-insaturadas e alcaloides saturados não são bioativados em ésteres tóxicos pirrólicos e não apresentam toxicidade (Mattocks 1986, Siciliano et al. 2005).

Os alcaloides pirrolizidínicos são encontrados em plantas de diversos taxa (como Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Apocynaceae) e evoluíram como um sistema químico de defesa sob pressão seletiva de insetos herbívoros de diferentes grupos taxonômicos que desenvolveram adaptações não só para detoxificá-los, mas também para permitir a exploração de fontes de APs e sua utilização na defesa contra predadores,

comunicação química e reprodução (Optiz & Müller 2009, Macel 2011, Trigo 2011). Em Lepidópteros, este fenômeno está associado à clados distintos como as borboletas Danaini e Ithomiini (Nymphalidae: Danainae) e mariposas Erebidae (Arctiinae) (Trigo et al. 1996, Weller et al. 1999, Conner & Weller 2004, Trigo 2008, 2011). Outros exemplos ocorrem em algumas espécies de besouros da família Crysomelidae (Pasteels & Hartmann 2004), no gafanhoto *Zonocerus variegatus* (Biller et al. 1994), no pulgão *Aphis jacobaeae* (Witte et al. 1990) e no hemíptero *Largus rufipennis* (Klitzke & Trigo 2000).

As mariposas da subfamília Arctiinae representam um dos melhores exemplos de estudo da utilização de APs por insetos herbívoros especializados. O impacto do sequestro de APs na biologia dessas mariposas, os mecanismos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos desenvolvidos por estas para adotarem esse sistema químico de defesa são extremamente sofisticados (Hartmann 2009), além do papel destes compostos na defesa química contra predadores e na comunicação sexual (Trigo 2011). A transferência estável de APs entre os estágios de desenvolvimento de arctíneos envolve um metabolismo eficiente que permite a transformação e convergência dos APs sequestrados para tecidos estratégicos e locais de proteção (Hartmann et al. 2009). Os alcaloides são sequestrados pela larva, e para transmissão à pupa sofrem um processo de transesterificação inseto-específica, originando “insect PAs”, alcaloides característicos de insetos, que são ésteres da base necina da planta esterificado com um ácido nécico originário do próprio inseto (Hartmann et al. 1990). Esse processo permite a insetos adaptados a APs sequestrar qualquer tipo de base necina da planta aumentando seu arsenal de defesa. Em arctíneos que sintetizam e emitem o feromônio sexual hidroxidanaidal (Figura 1), grande parte dos APs sequestrados dão origem ao hidroxidanaidal por meio de “insect PAs” como intermediário comum (Hartmann et al. 2003, 2004, Edgar 2007).

Dentro deste cenário, destaca-se a mariposa neotropical *Utetheisa ornatrix*, cuja larva

se alimenta de folhas e sementes verdes de plantas do gênero *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae); que produzem APs (Eisner & Meinwald 2003, Cogni & Futuyama 2009, Flores et al. 2009, Cogni et al. 2011, Trigo 2011). Larvas de *U. ornatix* sequestram esses alcaloides de suas plantas hospedeiras e os retêm durante toda a metamorfose; machos transmitem esses APs para as fêmeas por ocasião da cópula, e esta passa os alcaloides para os ovos (Eisner 2003, Hartmann 2009, Trigo 2011). Esses alcaloides defendem todos os estágios de desenvolvimento contra predadores (revisão em Eisner 2003, Trigo 2011). O processo de transmissão de APs do macho para a fêmea durante a cópula é intrincado. O macho adverte para a fêmea o conteúdo de AP em seus tecidos, via hidroxidanaidal, um feromônio sexual derivado de APs, emitido pela eversão da coremata durante a aproximação pré-copulatória (Eisner & Meinwald 2003). Fêmeas são capazes de discriminar machos com maior conteúdo de AP em função desse sinal feromonal emitido que é um reflexo da quantidade de AP do macho (Bezzerides & Eisner 2002). A capacidade de doação de AP do macho para fêmea durante a cópula é uma característica hereditária (Iyengar et al. 2002a). Por escolherem machos mais ricos em hidroxidanaidal, as fêmeas garantem vantagem fenotípica (recebendo uma quantidade maior de AP como presente nupcial) e genotípica (consequência da hereditariedade do tamanho corporal, uma vez que fêmeas escolhendo machos maiores terão descendentes maiores, com uma capacidade maior de sucesso reprodutivo) (Iyengar et al. 2002b).

Larvas de *U. ornatix* se alimentam de diferentes espécies de *Crotalaria*, que apresentam diferentes APs e diferentes concentrações em folhas e frutos (Ferro et al. 2006, Flores et al. 2009). Portanto, essas larvas devem ser adaptadas para a utilização de APs. Apesar de alguns exemplos onde o sequestro de compostos secundários de plantas por insetos herbívoros para defesa contra predadores tem mostrado serem livres de custos (Holloway et al. 1991, Holloway et al. 1993), demandas conflitantes entre o nível de defesa química em

insetos e outras características de aptidão (sobrevivência, taxa de crescimento, peso e reprodução) têm sido geralmente descritas (Bowers 1992, Longson & Joss 2006).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade metabólica de *Utetheisa ornatrix* em lidar com diferentes classes estruturais de APs e o impacto do sequestro dessas substâncias no desempenho de larvas e adultos, assim como o papel na defesa química contra predadores e na comunicação sexual dos adultos. Escolhemos APs que apresentam distintas atividades toxicológica, genotóxica e deterrente em vários sistemas biológicos estudados (Culvenor et al. 1976, Frei et al. 1992, Trigo 2011). Usamos três APs em sua forma base livre. A monocrotalina é um alcaloide 1,2 desidropirrolizidínico (Figura 1) com alta atividade toxicológica e genotóxica (Culvenor et al. 1976, Frei et al. 1992), além de ser um potente deterrente contra herbívoros em plantas (Gonzalez-Coloma 2002) e contra predadores em insetos (Trigo 2011). A retronecina é uma base necina insaturada na posição 1,2 (Figura 1) e não apresenta atividade toxicológica, genotóxica ou deterrente (Culvenor et al. 1976, Frei et al. 1992, Silva & Trigo 2002). Esse alcaloide é transformado em “insect PA” em vários Arctiinae (Hartmann 2009). A platinecina é uma base necina saturada na posição 1,2 e não apresenta atividade toxicológica ou genotóxica (Culvenor et al. 1976, Frei et al. 1992); APs com essa base necina também não apresentam atividade deterrente (Siciliano et al. 2005, Reinhard et al. 2009). Esse alcaloide também é transformado em “insect PA” insaturado em alguns Arctiinae (Hartmann 2009). Especificamente as seguintes perguntas foram levantadas:

(1) Como diferentes classes estruturais de APs são metabolizadas, transformadas em alcaloides característicos de insetos (“insect PAs”) e utilizadas na biossíntese de feromônios sexuais por machos?

(2) Existe um custo em termos de desempenho e aptidão no sequestro de diferentes classes estruturais de APs?

(3) Como diferentes estruturas de APs afetam os parâmetros fisiológicos e nutricionais do consumo e utilização de alimento em larvas de *U. ornatrix*?

(4) Existe uma relação entre os custos em termos de desempenho (i.e. crescimento e reprodução) associada ao sequestro de diferentes classes estruturais de APs e a eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatrix*?

(5) Como diferentes classes estruturais de APs e seus metabólitos atuam na defesa química de diferentes fases da ontogenia de *Utetheisa ornatrix* contra diferentes predadores?

## MATERIAL E MÉTODOS

### SISTEMA ESTUDADO

Para investigarmos a capacidade metabólica de *Utetheisa ornatix* em lidar com diferentes classes estruturais de APs e o impacto do sequestro dessas substâncias no desempenho de larvas e adultos, assim como o papel na defesa química contra predadores e na comunicação sexual foi necessário à manutenção de uma grande colônia da mariposa no Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP. Adultos foram coletados em uma área rural em Campinas, SP, Brasil (22°44'10.63"S, 47° 4'19.46"O) caracterizada predominantemente por pastagens dominadas por *Brachiaria* sp. (Poaceae) e várias espécies de plantas daninhas, e por *Crotalaria pallida*, uma das principais plantas hospedeiras de *U. ornatix* na região de Campinas (Cogni 2010, Cogni et al. 2011; Cogni et al. 2012); outras duas espécies de *Crotalaria* estavam sempre presentes: *C. incana* e *C. lanceolata* (Ferro et al. 2006). O gênero *Crotalaria* possui uma distribuição Pantropical e algumas espécies ocupam as regiões mais quentes do Neártico (Polhill 1892). No campo, as fêmeas de *U. ornatix* depositam massas de ovos nas folhas de *C. pallida* (que possuem de  $5,4 \times 10^{-2}$  µg/mg de APs segundo Ferro et al. 2006) e no momento da eclosão as larvas se alimentam destas nos primeiros dias de vida até perfurarem as vagens e se alimentarem das sementes verdes, as quais contém, na área estudada, uma concentração de  $2,4 \times 10^{-1}$  µg/mg APs segundo Ferro et al. (2006). Esta espécie de *Crotalaria* caracteriza-se pela presença de APs macrocíclicos de 12 membros do tipo senecionina (por volta de 85% de usaramina e 15% de integerrimina) (Ferro et al. 2006; Flores et al. 2009). Imediatamente após a coleta, os adultos foram trazidos para o laboratório, sexados de acordo com Travassos (1946) e mantidos em uma câmara de criação climatizada a 27 °C (12h luz: 12h escuro; UR

60-70%). Para a obtenção de ovos nós acondicionamos em 10 tubos cilíndricos de papel (8 cm de diâmetro × 11 cm altura), 4 machos e 2 fêmeas para facilitar o acasalamento, uma vez que durante o período de vida adulta as fêmeas podem copular em média com 11 machos (Bezzerides & Eisner 2002). Os casais foram alimentados com solução aquosa de mel 5% (Cogni et al. 2012, Hoina et al. 2012). A cada três dias nós coletávamos os ovos depositados na parede do cilindro de papel e estes eram agrupados em um recipiente plástico (5 cm de diâmetro × 6 cm de altura) até o momento da eclosão. Para evitarmos o efeito parental, uma vez que nesta espécie ocorre uma transferência biparental de APs e nutrientes para os ovos (Eisner & Meinwald 1995), larvas recém-eclodidas foram criadas em dieta artificial a base de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) sem AP de acordo com Signoretti et al. (2008) (ver experimentos de desempenho) até a fase adulta. Desse modo, os adultos foram novamente acondicionados como explicitado anteriormente para obtenção de ovos sem AP.

#### EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E SÍNTESE DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Para investigarmos como diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos são metabolizadas e afetam o desempenho e a defesa química de larvas e adultos de *Utetheisa ornatrix* nós incorporamos em dieta artificial os seguintes APs:

(a) A monocrotalina, um diéster macrocíclico de 11 membros com insaturação na posição 1,2 do anel pirrolizidínico (Figura 1), encontrada em várias espécies de *Crotalaria* das secções *Crotalaria* e *Calycinae* (Flores et al. 2009). Nós isolamos a monocrotalina na forma de base livre a partir de sementes secas de *C. spectabilis*, extraídas de acordo com o procedimento ácido-básico descrito em Trigo et al. (1996). As sementes foram homogeneizadas em liquidificador na presença de EtOH (5x peso/volume). O homogenato foi filtrado a vácuo e o resíduo final foi extraído mais duas vezes como acima. O extrato

etanólico foi seco em rotaevaporador à baixa pressão à 40°C, e recuperado com uma solução aquosa de HCl 1N. A fase aquosa ácida foi extraída três vezes com mesmo volume de CHCl<sub>3</sub> em funil de separação e posteriormente deixada sob agitação com excesso de Zn metálico por 3h em pH próximo de 1 para redução dos APs *N*-óxidos em base livre. O excesso de Zn foi retirado por filtração a vácuo e a fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH<sub>4</sub>OH até o pH 14. A fase aquosa básica resultante foi extraída três vezes com o mesmo volume de CHCl<sub>3</sub>:EtOH (4:1) em funil de separação. As frações orgânicas foram reunidas, secas em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporadas a baixa pressão como descrito anteriormente, resultando em uma fração de alcaloides totais (monocrotalina base livre + *N*-óxido). A monocrotalina foi recristalizada com acetona anidro e armazenada a -20°C.

(b) A retronecina, uma base necina com insaturação na posição 1,2 do anel pirrolizidínico (Figura 1), encontrada em várias espécies de *Crotalaria* das secções *Calycinae*, *Chrysocalycinae* e *Hedriocarpae* (Flores et al. 2009). Nós obtivemos a retronecina a partir da hidrólise básica da monocrotalina de acordo com Homervale et al. (1990). Uma solução aquosa de monocrotalina contendo 2 equivalentes de Ba(OH)<sub>2</sub> foi agitada durante duas horas a 40-50°C. Posteriormente a solução foi refluxada por duas horas a 80°C. Deixamos a reação atingir a temperatura ambiente e a tratamos com uma solução de CO<sub>2</sub> sólido para precipitação do Ba como BaCO<sub>3</sub>. Após o tratamento, a solução permaneceu em repouso por 16 horas e foi filtrada em Celite 545, o solvente seco a baixa pressão no rotaevaporador e o resíduo recuperado em MeOH, obtendo-se um rendimento de 95%. Quando necessário nós purificamos a reação resultante por cromatografia de adsorção em coluna [40 cm x 2,5 cm, fase estacionária sílica gel 70-325 mesh e fase móvel: CHCl<sub>3</sub>: MeOH: Et<sub>3</sub>N (13:5:2)] e a retronecina foi caracterizada nas frações por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 (F<sub>254</sub> - Merck) de 0,2 mm de espessura (10x5 cm), utilizando-se como eluente o sistema CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (5:5:2, v/v/v/), utilizando vapor de I<sub>2</sub> como revelador. Para a

detecção dos APs, após o termino da cromatografia as placas foram secas a temperatura ambiente e reveladas em câmara de iodo por 10 minutos e aquecidas em placa de aquecimento a 100°C, apresentado uma coloração roxa escura. A retronecina apresenta um Rf de 0,5. A retronecina foi cristalizada em acetona anidro e armazenada a -20°C.

(c) A platinecina, uma base necina similar a retronecina, sem a insaturação na posição 1,2 do anel pirrolizidínico (Figura 1); essa base necina é raramente encontrada em *Crotalaria* e está presente somente em APs saturados de *C. breviflora* da secção *Calycinae* (Flores et al. 2009). Nós preparamos a platinecina por meio da hidrogenação catalítica da retronecina de acordo com Marín-Loaiza et al. (2008). Uma solução de 23 mg de retronecina em 4 mL de tetrahidrofurano anidro, contendo 1 mg de ródio em carvão ativado (Fluka®) foi agitada em pressão de hidrogênio por 16h no escuro. O ródio foi filtrado sob Celite 545 e o solvente evaporado em fluxo de N<sub>2</sub>. Essa operação foi repetida várias vezes e as frações resultantes foram reunidas. Quando necessário isolamos a platinecina por cromatografia de adsorção em coluna acompanhando por CCD como descrito acima para a retronecina. A platinecina foi cristalizada com acetona anidro, armazenada a -20°C.

Nós analisamos a quantidade de APs sequestrados e transformados bioquimicamente em larvas, pupas, machos e fêmeas de *U. ornatix* que se alimentaram em dieta contendo os APs acima em diferentes concentrações (ver experimentos de desempenho). Liofilizamos os indivíduos acima durante 48 horas em um liofilizador (Labconco Freezone 6 Liter Freeze Dry System, Model 77530). Obtivemos a massa dos mesmos em uma balança analítica (Mettler Toledo modelo New Classic MS) e homogeneizamos os indivíduos separadamente em EtOH (5x massa /volume) em tubos de vidro com areia do mar extra pura (J.T. Baker) utilizando um bastão de vidro. Os extratos etanólicos foram centrifugados durante 10 minutos a 2318 fcr x g. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Os sobrenadantes foram agrupados e secos em rotaevaporador à baixa pressão, à temperatura de 40°C. O extrato foi ressuspendido

em 10 mL de EtOH e parte deste (1/3) foi utilizado para quantificação dos alcaloides. O restante do extrato etanólico foi extraído de acordo com o procedimento ácido-básico descrito em Trigo et al. (1996), utilizando uma coluna de fase sólida Extrelut (Merck) para a extração da fase básica na proporção de 1,2g de Extrelut para cada ml da fração aquosa básica (Hartmann & Toppel 1987). Nós eluímos a coluna com  $\text{CHCl}_3$  (5x volume para cada grama de Extrelut) para a extração dos APs. A fração alcaloidal foi seca em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporada a baixa pressão como descrito anteriormente. Os APs foram recuperados em 1ml de MeOH, secos em corrente de  $\text{N}_2$  e armazenados a  $-4^\circ\text{C}$  para posterior caracterização.

Para investigarmos se diferentes classes estruturais de APs são utilizadas na biossíntese do feromônio sexual de machos, o hidroxidanaidal, após 24h da emergência da pupa, os machos (n=3) que se alimentaram em dieta com diferentes APs na maior concentração (ver experimentos de desempenho) foram submetidos a um processo denominado coremactização. Nós pressionávamos com os dedos o abdômen do mesmo e com o auxílio de uma tesoura cirúrgica a coremata era retirada e imediatamente armazenada em  $\text{CHCl}_2$  (500  $\mu\text{L}$ ) a  $-4^\circ\text{C}$  para posterior caracterização.

Nós também sintetizamos em laboratório algumas classes de APs encontradas ou não em *U. ornatix*, para verificarmos o papel destes compostos na defesa química contra predação (ver Defesa química em *Utetheisa ornatix*: o efeito do tipo e concentração de alcaloides pirrolizidínicos em diferentes predadores).

(a) A monocrotalina *N*-óxido (MNO) é o alcaloide encontrado nas diferentes fases de vida de *U. ornatix* que se alimentaram em dieta artificial contendo monocrotalina base livre (Tabela 2). Nós obtivemos a MNO a partir da reação de 1,0 equivalente da monocrotalina base livre em 5 mL de clorofórmio anidro contendo 1,2 equivalentes do ácido metacloroperbenzoico. A reação foi mantida em banho de gelo sob agitação constante por três horas até a solução atingir a temperatura ambiente de acordo com Zalkow et al. (1985).

Nós isolamos a MNO por cromatografia de adsorção em coluna (40 cm x 2,5 cm) utilizando como fase estacionária alumina básica (ICN Pharmaceuticals GmbH & Co.) e um gradiente de 100% CHCl<sub>3</sub> até CHCl<sub>3</sub>:MeOH (70:30) como fase móvel. Acompanhamos a CCD como descrito acima, usando como eluente o sistema CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (83:14:3, v/v/v). Nós cristalizamos a MNO em acetona anidro e armazenamos a -20°C.

(b) A retronecina *N*-óxido (RNO) é um alcaloide encontrado nas diferentes fases de vida de *U. ornatrix* que se alimentaram em dieta artificial contendo retronecina base livre e platinecina base livre (Tabela 2). Nós obtivemos a RNO da mesma forma que obtivemos a MNO, usando como solvente metanol grau HPLC (99,8%; J.T. Baker). Nós isolamos a RNO por cromatografia de adsorção em coluna e acompanhamos a purificação do composto por CCD como descrito acima, usando como eluente o sistema CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (5:5:2, v/v/v) e a retronecina base livre como padrão. Nós cristalizamos a RNO em acetona anidro e armazenamos a -20°C.

(c) A platinecina *N*-óxido (PNO) é um alcaloide encontrado nas diferentes fases de vida de *U. ornatrix* que se alimentaram em dieta artificial contendo platinecina base livre (Tabela 2). Nós obtivemos a PNO da mesma forma que obtivemos a RNO a partir da reação de 1,0 equivalente da platinecina base livre como descrito anteriormente. Nós isolamos a PNO por cromatografia de adsorção em coluna e acompanhamos a purificação do composto por CCD procedendo do mesmo modo para a obtenção da RNO utilizando a platinecina base livre como padrão. Nós cristalizamos a PNO em acetona anidro e armazenamos a -20°C

(e) O 9-O-(±)-3-metilpentanoato de retronecina *N*-óxido é um alcaloide semisintético análogo à creatonotina B *N*-óxido. Esse AP foi sintetizado a partir da esterificação da retronecina base livre com o ácido (±)-3-metilpentanoico. Nós utilizamos este composto para verificarmos a relação estrutura/atividade anti-predação contra *N. clavipes* referente à insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico e um ácido néxico esterificado no C9 diferente daquele

biossintetizado por *U. ornatrix*. A parte ácida do composto apresenta um grupo metil no C3 enquanto que os APs biossintetizados pela mariposa adicionalmente apresentam um grupo hidroxila no C2 do ácido néico (Figura 1). Esta substância não é encontrada em *U. ornatrix*. Em um balão de vidro de 50 mL com 2 mL de clorofórmio anidro dissolvemos 1,0 equivalente de retronecina base livre e uma quantidade catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP) adicionamos 2 mL de clorofórmio anidro contendo 2,0 equivalentes do ácido ( $\pm$ )-3-metilpentanoico e 1,5 equivalentes de dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Nós mantivemos a solução resultante em agitação constante por 48 horas sob pressão de nitrogênio à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD utilizando-se como eluente o sistema  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (83:14:3, v/v/v). Nós centrifugamos a amostra durante 10 minutos a 2318 fcr x g, o sobrenadante foi retirado e seco em rotaevaporador à baixa pressão, à temperatura de 40°C. Nós isolamos o 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de retronecina por cromatografia de adsorção em coluna e CCD como descrito acima. *N*-oxidamos e isolamos o 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de retronecina como descrito anteriormente. Nós cristalizamos o 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de retronecina *N*-óxido em acetona e armazenamos a -20°C.

(f) 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de platinecina *N*-óxido, é um alcaloide semisintético análogo a 1,2 diidrocreatonotina B *N*-óxido, sintetizado a partir da esterificação da platinecina base livre com o ácido ( $\pm$ )-3-metilpentanoico (Figura 1). Este composto caracteriza-se pelo anel pirrolizidínico saturado e um ácido néico esterificado no C9 diferente daquele biossintetizado por *U. ornatrix*. Esta substância não é encontrada em *U. ornatrix*. Para a obtenção do composto na forma de base livre e posterior *N*-oxidação nós procedemos como descrito para a síntese do 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de retronecina *N*-óxido, utilizando a platinecina base livre ao invés da retronecina.

## QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

*Análise quantitativa de alcaloides pirrolizidínicos por colorimetria.*

Nós analisamos a quantidade de APs sequestrados durante os diferentes estágios de desenvolvimento de *U. ornatrix* que se alimentaram em dieta contendo os três APs utilizados neste trabalho em diferentes concentrações (ver experimentos de desempenho). Os alcaloides totais (bases livres + *N*-óxidos) foram quantificados por colorimetria de acordo com Trigo et al. (1993), utilizando-se uma alíquota da fração etanólica dos organismos extraídos como acima. Para cada indivíduo, nós realizamos a leitura em triplicata, utilizando a média de absorvância para o cálculo da quantidade de APs. Como padrão para a construção da curva de calibração usamos monocrotalina obtida como descrito anteriormente (absorvância =  $0,393 \cdot x \mu\text{g}$  de monocrotalina,  $r^2 = 0,987$ ). Para a leitura da absorvância usamos um espectrofotômetro digital, modelo SP-22, marca Biospectro (faixa de leitura 325-1000nm) com resolução de  $\pm 0,078$  A. Nós expressamos os valores de concentração de APs em *U. ornatrix* em  $\mu\text{g}$  de AP/mg de massa seca. Nós quantificamos os APs presentes em 10 organismos para cada fase de desenvolvimento (larva, pupa, macho e fêmea) para cada tipo de alcaloide incorporado em dieta em quatro concentrações diferentes (ver Desempenho de *Utetheisa ornatrix* em diferentes concentrações de três alcaloides pirrolizidínicos) totalizando 480 indivíduos.

*Caracterização e quantificação dos alcaloides pirrolizidínicos por métodos cromatográficos*

Nós caracterizamos os APs incorporados em dieta artificial, os APs sintetizados para os bioensaios de predação e os APs metabolizados nas diferentes fases de desenvolvimento de *U. ornatrix*, bem como o feromônio sexual hidroxidanaidal presente na coremata de machos. Nós utilizamos cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) de acordo com Trigo et al. (2003) e Flores et al. (2009). As análises foram efetuadas em um cromatógrafo gasoso Hewlett Packard série 6890 acoplado a um detector de massas Hewlett Packard série 5973, equipado com uma coluna de sílica fundida capilar (HP-5 5%-fenil 95%-dimetilsiloxano, 30m comprimento x 250 $\mu$ m diâmetro interno x 0,25 $\mu$ m de espessura de filme). Usamos a temperatura de injeção a 250°C, o programa de temperatura de 70-300°C, 4°C/min ou 150-300°C, 4°C/min, a temperatura da linha de transferência a 280°C, o fluxo do gás de arraste (He) a 1mL/min e os modos de injeção com ou sem razão de divisão. No modo com razão de divisão usamos a razão 20:1. A concentração da amostra a ser injetada foi 10 mg/mL para o modo com razão de divisão e 1 mg/mL para o modo sem razão de divisão. O volume utilizado para injeção foi de 1 $\mu$ L. Os APs foram caracterizados por meio da comparação dos padrões de fragmentação de massas e os índices de retenção (IR) com a literatura. O IR foi calculado segundo (van den Dool & Kratz 1963) coinjetando as amostras com *n*-alcanos (de C<sub>12</sub> até C<sub>40</sub>). Os padrões de fragmentação foram obtidos em Flores et al (2009), Hartmann et al. (2004, 2005a,), Marín-Loaiza et al. (2008) e Schulz et al (2004).

DESEMPENHO DE *UTETHEISA ORNATRIX* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRÊS ALCALOIDES  
PIRROLIZIDÍNICOS

Para investigarmos os custos associados ao sequestro de diferentes formas estruturais de APs no desempenho e aptidão de *Utetheisa ornatrix* modificamos o desenho experimental utilizado por Cogni et al. (2012) usando dois enfoques em relação a concentração de APs.

No primeiro experimento usamos a concentração em  $\mu\text{g}$  de APs/mg de massa seca da dieta (expressa em % de APs/mg dieta) com os três APs na forma base livre descritos acima em quatro concentrações. A variação da concentração de AP na dieta mimetiza em parte as concentrações encontradas em diferentes plantas hospedeiras de *U. ornatrix* (Cogni et al. 2011). A concentração base é aquela encontrada em sementes verdes de *C. pallida* por Ferro et al. (2006),  $2,4 \times 10^{-2}\%$ . Usamos ainda uma dieta controle sem APs (0,0% de APs), uma dieta com 0,2x a concentração encontrada em *C. pallida*,  $4,8 \times 10^{-3}\%$  de AP, e uma com 5x a concentração de *C. pallida*,  $1,2 \times 10^{-1}\%$ .

No segundo experimento usamos a concentração de APs em equivalentes molares/mg de massa seca da dieta com os três APs na forma base livre descritos acima em duas concentrações: a concentração controle com 0 equivalentes de APs/mg de dieta e  $2,94 \times 10^{-4}$  moles de APs/mg de dieta. Esta concentração se equivale a 0,12% da massa seca da dieta tomando-se por base a retronecina. Portanto, em termos de percentagem de APs/mg de massa seca da dieta nessa quantidade equivalente temos: 0,121% de platinecina na dieta e 0,251% de monocrotalina na dieta. Este abordagem é importante, pois nos permitiu investigar com maior clareza a relação entre a estrutura do AP e o efeito nos parametros de desempenho medidos em *U. ornatrix* se alimentando em dietas contendo o mesmo número de moléculas por mg de massa seca de diferentes estruturas de APs (que por sua vez possuem diferentes massas moleculares :monocrotalina =325 g/mol, retronecina = 155 = g/mol e platinecina= 157

g/mol).

A dieta artificial foi preparada de acordo com Signoretti et al. (2008). Nós cozinhamos 130g de feijão branco e 30g de cenoura em uma panela de pressão com 1,5L de água por uma hora. Após o cozimento nós homogeneizamos a dieta no liquidificador com 20g de levedura de cerveja e adicionamos uma solução de ágar (7g em 250 mL de água). Esperamos que a temperatura chegasse abaixo de 60°C e adicionamos na dieta uma solução de 40 ml de água contendo uma mistura de vitaminas, antibióticos e antifúngicos e continuamos a homogeneizar a dieta em liquidificador. Após esse processo, os APs foram dissolvidos em óleo vegetal e misturados na mesma a 40°C. A dieta foi transferida para tubos de vidro de 10 mL, esterilizadas por 10 minutos em câmara UV-C germicida (254nm) e deixadas à temperatura ambiente por 12h para secar. Os tubos foram fechados com algodão higrófilo e armazenados em geladeira a 4-8°C até o momento de sua utilização. Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de criação climatizada a 27°C (12h luz: 12h escuro; UR 60-70%). Os ovos sem alcaloide provenientes de casais de adultos que foram criados em dieta sem AP por pelo menos uma geração (ver sistema estudado) foram aleatoriamente armazenados em potes plásticos até o momento da eclosão. As larvas de primeiro instar foram transferidas individualmente para tubos de vidro de 10 mL contendo aproximadamente 1 mL da dieta artificial com diferentes concentrações dos diferentes APs durante a primeira semana de desenvolvimento. Após esse período foram alimentadas com aproximadamente 3 mL de dieta por tubo até o momento da pupação. A cada três dias os tubos com dieta eram trocados se necessário, isto é, se a larva tinha comido grande parte da dieta ou se a dieta apresentava sinais de fungos. As larvas eram colocadas em tubos com novas dietas semanalmente. Hoina et al. (2012) demonstraram que não ocorre degradação quantitativa e qualitativa dos APs nas dietas durante o período larval de *U. ornatrix*.

Como medidas de desempenho (de acordo com Thompson 1988), nós medimos a

sobrevivência larval até o adulto, massa larval (com 21 dias de desenvolvimento para o primeiro experimento e com 21 e 28 dias para o segundo experimento), tempo de desenvolvimento larval (da eclosão do ovo a pupação), massa da pupa (sete dias após a pupação) e massa fresca dos adultos 24h após a emergência.

Para analisarmos os aspectos nutricionais de consumo e utilização de alimento no segundo experimento adotamos um método gravimétrico com base na massa seca para determinarmos o ganho de massa, consumo de alimento e produção de fezes durante a quarta semana de experimento. Obtivemos a massa seca inicial e final das larvas no dia 21 e 28 por meio de um fator de conversão da massa seca esperada utilizando cinco larvas para cada tipo de alcaloide incorporado em dieta. Para estimarmos a massa seca inicial da dieta oferecida no dia 21 utilizamos cinco tubos de dieta como descrito acima para cada tratamento sem a presença da larva para determinarmos a dessecação após 48h de liofilização. Nós calculamos a massa seca da dieta consumida subtraindo a massa seca da dieta não consumida no dia 28 da massa seca inicial da dieta oferecida no dia 21 para as larvas. Nós coletamos e pesamos as fezes produzidas diariamente durante a quarta semana do experimento. Estas foram armazenadas a  $-4^{\circ}\text{C}$ , liofilizadas durante 48h e pesadas novamente para obtenção do fator de conversão da massa seca das fezes.

Nós calculamos os índices nutricionais abaixo descritos de acordo com Waldbauer (1968), Scriber & Slansky (1981) e Miller & Feeny (1983):

(1) A taxa de crescimento relativo ( $TCrR$ ), expressa pela quantidade em mg de massa seca ganha pela larva por mg de massa seca inicial da mesma durante o período de alimentação  $T$ .

(2) A taxa de consumo relativo ( $TCoR$ ), expressa pela quantidade em mg de massa seca de alimento consumido por mg de massa seca inicial da larva durante o período de alimentação  $T$ .

(3) Nós determinamos os parâmetros nutricionais da fase larval abaixo descritos utilizando as variáveis:  $T$  = duração do período de alimentação,  $I$  = massa do alimento (mg) ingerido durante  $T$ ,  $F$  = massa das fezes (mg) produzidas durante  $T$ ,  $B$  = ganho de massa (mg) pelas larvas durante  $T$ . Sendo assim,  $M = (I-F)-B$ , representa o alimento metabolizado durante  $T$ , ou seja, parte do alimento assimilado que foi utilizado na forma de energia para o metabolismo. Desse modo, calculamos os seguintes índices nutricionais relativos ao consumo e utilização do alimento para cada tratamento:

Taxa metabólica relativa [ $TMR = (M/BT)100$ ].

Eficiência de conversão do alimento ingerido [ $ECI = (B/I)100$ ].

Eficiência de conversão do alimento digerido { $ECD = [B/(I-F)]100$ }.

Digestibilidade aproximada { $AD = [(I-F)/I]100$ }

Custo metabólico ( $CM = 100-ECD$ ).

No primeiro experimento, para verificarmos o efeito do sequestro de diferentes APs no desempenho de adultos de *U. ornatrix*, utilizamos larvas que desde a eclosão até a pupação foram alimentadas em dieta contendo 0,0% de AP,  $2,4 \times 10^{-2}\%$  e  $1,2 \times 10^{-1}\%$  de AP. Após a emergência os adultos foram divididos em 3 tratamentos no qual um macho e uma fêmea foram pareados por tratamento (n=16): (1) 0,0%, (2)  $2,4 \times 10^{-2}\%$  e (3)  $1,2 \times 10^{-1}\%$ . A concentração  $4,8 \times 10^{-3}\%$  de AP da massa seca da dieta não foi usada para formação de casais, pois nosso objetivo foi investigar o efeito das duas maiores concentrações de AP na dieta no desempenho dos adultos de *U. ornatrix*. As condições de acasalamento para cada casal foram às mesmas anteriormente citadas. Diariamente nós checamos a ocorrência de oviposição e morte dos adultos. A longevidade dos adultos foi definida como o número de dias da emergência até a morte. A fecundidade foi calculada a partir do número total de ovos depositados por fêmea durante toda sua vida. A fertilidade foi definida como o número de larvas que eclodiram dos ovos depositados pelas fêmeas.

No segundo experimento, para verificarmos o efeito do sequestro de diferentes APs no desempenho de adultos de *U. ornatrix*, utilizamos larvas que desde a eclosão até a pupação foram alimentadas em dieta contendo 0,0% de AP (controle) e  $2,94 \times 10^{-4}$  mol de monocrotalina, retronecina e platinecina. Após a emergência os adultos foram divididos em quatro tratamentos (controle, monocrotalina, retronecina e platinecina) no qual um macho e uma fêmea foram pareados entre si para cada tipo de AP (n=16). As condições de acasalamento para cada casal e as medidas de desempenho foram às mesmas anteriormente citadas.

DEFESA QUÍMICA EM *UTETHEISA ORNATRIX*: O EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE ALCALOIDES  
PIRROLIZIDÍNICOS EM DIFERENTES PREDADORES

Para investigarmos como diferentes concentrações de diferentes APs consumidos por larvas de *U. ornatrix* e seus metabólitos influenciam a defesa de larvas e adultos contra predação usamos três espécies de predadores: as aranhas *Nephila clavipes* (Nephilidae) e *Lycosa erythrognatha* (Lycosidae), e pintinhos *Gallus gallus* (Phasianidae). Nós utilizamos larvas e adultos provenientes do primeiro experimento, ou seja, indivíduos que se alimentaram enquanto larva em dieta contendo diferentes APs em diferentes concentrações. A permissão para a pesquisa com esses animais foi fornecida pelo IBAMA-ICMBio (Ministério do Meio Ambiente, Brasil).

*Bioensaio de predação com a aranha Nephila clavipes*

A aranha *N. clavipes* é uma espécie de distribuição pantropical, encontrada frequentemente em bordas de clareiras em florestas, ao longo de trilhas na mata, nas bordas de mananciais e riachos, locais onde geralmente insetos são observados voando. Essa espécie preda abelhas, vespas, borboletas e mariposas, mas libera insetos que apresentam APs (Trigo 2011). *N. clavipes* ocorre simpatricamente com *U. ornatrix*, e esta mariposa pode cair na teia de *N. clavipes* durante o forrageio, acasalamento e na busca de plantas hospedeiras para oviposição (Eisner 2003). Quando uma presa cai em sua teia, essa aranha se desloca rapidamente do centro desta para próximo da presa, passando a tocá-la com os primeiros pares de patas, quelíceras e pedipalpos; se a presa é palatável, a aranha injeta veneno, paralisando a mesma, envolve-a com fios de seda e a carrega para o centro da teia, onde começa a sugá-la (Robinson & Mirick 1971). Se após a inspeção inicial a aranha recusa a presa por ser

impalatável, a teia ao redor desta é cortada e a presa geralmente é liberada ileso (Vasconcellos-Neto & Lewinsohn 1984).

Nós dividimos as respostas de *N. clavipes* às presas oferecidas nos ensaios em predação e liberação [segundo Robinson e Mirick (1971) e Vasconcellos-Neto e Lewinsohn (1984)]. Também consideramos como predação o comportamento da aranha de injetar veneno na presa, mesmo se após este primeiro contato, a aranha liberasse a presa morta; uma resposta definida como “rejeição” por Vasconcellos-Neto & Lewinsohn (1984). Nós realizamos os bioensaios de predação com *N. clavipes* em dois fragmentos de floresta na região de Campinas (São Paulo, Brasil): Mata Santa Genebra (22°49'39.06"S, 47° 6'18.27"W) e o Parque Ecológico Hermógenes de Freitas Leitão Filho (22°48'36.96"S, 47° 4'31.02"W). Nós realizamos os bioensaios entre fevereiro e maio, época em que as aranhas ocorrem em abundância, no período diurno (das 9:00 às 16:00 h). Nós utilizamos somente aranhas fêmeas adultas e saudáveis, que respondiam imediatamente quando uma presa era jogada na sua teia. Uma fêmea era testada uma única vez durante um dia e caso necessário utilizar a mesma aranha novamente nós esperamos um período de no mínimo uma semana.

Usamos adultos recém-emergidos de *U. ornatrix* (10 indivíduos por sexo para cada concentração de AP na dieta, e cada tipo de AP na dieta, totalizando 240 indivíduos testados). Um dia após emergirem da pupa, esses adultos eram armazenados à -20°C, durante um período máximo de uma semana, até a realização do bioensaio. Transportamos os adultos em uma caixa de isopor com gelo picado e sal (-5°C) até o local do bioensaio. Com o auxílio de uma pinça de colecionador de selos, lançamos os adultos individualmente na metade inferior da teia de *N. clavipes*, e observamos o comportamento da aranha, conforme descrito acima. Quando a aranha matava e levava o indivíduo para o centro da teia, o experimento estava validado e terminado. Se a aranha liberava o indivíduo ou “rejeitava” o mesmo, oferecíamos um adulto de *U. ornatrix*, cujas larvas tinham se alimentado em dieta sem APs. Se a aranha

predasse esse indivíduo, utilizado como controle de saciedade, garantindo que a liberação da presa não foi por falta de apetite, o experimento era validado, senão o experimento era descartado. Nos bioensaios, se após 10 minutos a aranha não apresentasse qualquer resposta, com o auxílio da pinça, retirávamos o adulto da teia e lançávamos para outra aranha.

Como encontramos os APs *N*-óxidos creatonotina B, isocreatonotina B e 1,2 dihidrocreatonotina B em *U. ornatrix* (ver Resultados) nós verificamos o papel de dois análogos desses alcaloides [9-O-(±)-3-metilpentanoato de retronecina, análogo à creatonotina B e 9-O-(±)-3-metilpentanoato de platinecina, análogo à 1,2 dihidrocreatonotina B] na proteção química contra *N. clavipes*. Comparamos a atividade dessas estruturas com a atividade dos alcaloides *N*-óxidos, cujas bases livres foram incorporadas na dieta (monocrotalina, retronecina e platinecina). Tratamos larvas palatáveis do besouro *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae), mortas por congelamento, com 10 µL de uma solução de metanol com 3,0 µg de APs/mg de massa seca do besouro. Essa concentração foi determinada em função da resposta de *N. clavipes* à concentração de APs em adultos de *U. ornatrix*, que se alimentaram da dieta contendo 0,12% de monocrotalina; nessa concentração a aranha libera 85% das presas (ver Resultados). Verificamos também se a concentração de APs é um fator que influencia na defesa química contra a aranha, testando os APs em uma concentração dez vezes menor (0,3 µg/mg de massa seca). Usamos o mesmo delineamento experimental descrito acima, utilizando como controle para validação dos bioensaios, larvas de *T. molitor* tratadas com uma solução de metanol. Nós testamos dez presas para cada um dos 5 tipos de APs *N*-óxido em 2 concentrações, totalizando 100 indivíduos.

*Bioensaio de predação com a aranha Lycosa erythrognatha*

A aranha *L. erythrognatha* é conhecida popularmente como aranhas-lobo; essas aranhas são predadoras de solo e geralmente emboscam suas presas, reagindo principalmente às vibrações causadas pelo bater de asas ou o caminhar de suas presas (Foelix 2011). Pistas visuais também tem um papel na detecção destas, mas os olhos das aranhas-lobo visualizam somente uma imagem grosseira, e somente presas que estejam bem próximas serão percebidas (Foelix 2011). Larvas de *U. ornatrix* podem ser potencialmente vulneráveis à predação por *L. erythrognatha* quando essas se locomovem para longe de sua planta hospedeira, em busca de um local de pupação (Eisner & Eisner 1991), ou quando as larvas caem de sua planta hospedeira, devido a eventos estocásticos (vento, ataque de formigas, Gonzáles et al. 1999). Da mesma forma, adultos são vulneráveis à predação quando estão em repouso geralmente próximo de sua planta hospedeira.

Nós conduzimos os bioensaios de predação com *L. erythrognatha* utilizando o mesmo delineamento descrito por Gonzáles et al. (1999) e Massuda & Trigo (2009). Coletamos as aranhas em uma área de gramado no Campus da Universidade Estadual de Campinas (22°49'14,76"S, 47°4'12,38"W). Mantivemos as aranhas isoladamente em recipientes de vidro transparentes (14,5 cm de diâmetro x 18 cm altura) contendo uma pequena camada de areia fina no seu interior. Nós alimentamos as aranhas semanalmente com larvas palatáveis do besouro *T. molitor*, e fornecíamos água em um algodão umedecido, o qual era trocado diariamente. Utilizamos somente fêmeas que uma semana antes predaram uma larva de *T. molitor*. Cada aranha foi usada uma única vez.

Usamos larvas no 5º instar e adultos recém-emergidos (10 indivíduos para cada concentração de AP na dieta; nos adultos, testamos machos e fêmeas) para cada tipo de AP na dieta totalizando 120 larvas e 240 adultos. Com o auxílio de uma pinça de 30 cm de

comprimento, larvas e adultos foram oferecidos à aranha bem próximos as quelíceras da mesma. Nós consideramos a resposta da aranha como predação se as larvas ou adultos de *U. ornatix* fossem capturados, mortos e/ou consumidos; nesse caso o bioensaio era validado sem experimentos adicionais. Consideramos como liberação quando a aranha, após tocar o indivíduo com suas quelíceras, liberasse o mesmo ileso e esse sobrevivesse após 24 horas. Validávamos o bioensaio quando a aranha predava larvas e adultos de *U. ornatix* criados em dieta artificial sem APs.

#### *Bioensaio de predação com a ave Gallus gallus*

Escolhemos indivíduos jovens da ave *G. gallus* como um modelo de predador vertebrado, visualmente orientado, porque os mesmos são sensíveis à presas impalatáveis (Massuda & Trigo 2009 e referências que ali constam). Nós realizamos o bioensaio de acordo com Nogueira-de-Sá & Trigo (2005), e Massuda & Trigo (2009). Adquirimos indivíduos com um dia de idade em lojas de animais e os mantivemos em grupo no interior de uma gaiola (80×60×45 cm) durante uma semana em temperatura e fotoperíodo ambientes. Alimentávamos as aves *ad libitum* duas vezes ao dia a base de ração para aves e água. Após esse período, nós numeramos os seus pés com caneta de retroprojeter para posterior identificação. Nós os treinamos por três dias, duas vezes por dia, para aceitarem larvas e adultos vivos de *U. ornatix* criados em dieta artificial sem APs. Antes do treinamento, nós deixamos as aves por 2 horas sem alimentação. Após esse período individualizamos as aves em uma gaiola (30×30×40 cm) e oferecemos larvas ou adultos para as aves durante 2 min, em uma placa de Petri (6 cm de diâmetro). Descartamos indivíduos que não respondiam.

Após o terceiro dia de treinamento realizamos os bioensaios com larvas de 5º instar e adultos recém-emergidos de *U. ornatix* (10 indivíduos para cada concentração de AP na

dieta; nos adultos, testamos machos e fêmeas) para cada tipo de AP na dieta totalizando 120 larvas e 240 adultos. Nós utilizamos como grupo controle larvas e adultos criados em dieta sem APs. Após 2 horas de jejum, acondicionamos cada indivíduo de *G. gallus* em gaiolas, como descrito acima, e oferecemos inicialmente o primeiro controle (uma larva ou um adulto criado em dieta sem AP, dependendo se larva ou adulto iria ser testado posteriormente). Se a ave consumia o primeiro controle, nós oferecíamos uma larva ou adulto e observávamos a resposta da ave: (1) bica e consome, (2) bica, mata e descarta, (3) bica e libera a larva ou adulto vivo, e (4) não bica. As respostas (1) e (2) foram consideradas predação e a resposta (4) liberação. Na resposta (3), caso o indivíduo testado sobrevivesse ao ataque depois de 24 horas, consideramos liberação, caso contrário, predação. Se o indivíduo testado fosse liberado, nós validávamos o bioensaio somente se a ave predasse o segundo controle oferecido. Cada ave foi utilizada uma única vez.

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para verificarmos se a concentração de APs difere significativamente entre os diferentes estágios de desenvolvimento de *U. ornatrix* que enquanto larva se alimentou em dieta com diferentes APs em diferentes concentrações (primeiro experimento) usamos uma ANOVA de três fatores (Zar 2010). Utilizamos como fonte de variação o tipo de alcaloide na dieta, a concentração deste e o estágio de desenvolvimento (larva, pupa, macho e fêmea) de *U. ornatrix*. Quando os efeitos foram significativos, nós comparamos as diferenças *a posteriori* com um teste de Tukey. Além disso, efetuamos uma análise de componentes principais (Legendre & Legendre 1998) para verificar se larvas de *U. ornatrix* alimentadas com dietas com diferentes APs eram agrupadas em função dos APs em seus tecidos e se os outros estágios de desenvolvimento (pupa e adulto) apresentavam o mesmo padrão de

agrupamento.

Nós comparamos a proporção de larvas de primeiro instar que sobreviveram até a fase adulta no primeiro e no segundo experimento por meio de comparações múltiplas entre proporções como em Zar (2010, p. 557), seguida por uma comparação de cada proporção em relação à proporção das larvas que sobreviveram no grupo controle se o efeito fosse significativo (Zar 2010, p. 560).

No primeiro experimento, nós comparamos o efeito de cada tipo de AP incorporado na dieta em diferentes concentrações nas medidas de desempenho de larvas e adultos de *U. ornatrix* utilizando uma ANOVA de um fator (Zar 2010). Desconsideramos o fator sexo, desde que análises preliminares mostraram que esse fator não é responsável por diferenças significativas (dados não apresentados). Os dados foram devidamente transformados em ln e arco seno da raiz de p quando necessário, para atenderem aos pressupostos da ANOVA. Se os efeitos fossem significativos, nós comparamos as diferenças a posteriori com um teste de Tukey.

No segundo experimento, nós comparamos o efeito entre os diferentes APs incorporados na dieta em concentrações equimolares nas medidas de desempenho de larvas e adultos de *U. ornatrix*, bem como nos parâmetros fisiológicos de consumo e utilização do alimento (índices nutricionais) utilizando uma ANOVA de um fator (Zar 2010). Desconsideramos o fator sexo, desde que análises preliminares mostraram que esse fator não é responsável por diferenças significativas (dados não apresentados). Os dados foram devidamente transformados em ln e arco seno da raiz de p quando necessário, para atenderem aos pressupostos da ANOVA. Se os efeitos fossem significativos, nós comparamos as diferenças *a posteriori* com um teste de Tukey.

As frequências de predação ou liberação foram analisadas separadamente para larvas e adultos de *U. ornatrix* que se alimentaram enquanto larva em dieta contendo diferentes APs

em diferentes concentrações usando uma análise loglinear (Marascuilo & Busk 1987, Statistic 7.0, StatSoft, Inc. 2004). Consideramos os efeitos de predadores (3 níveis), APs (3 níveis), concentrações de APs (4 níveis) e as respostas dos predadores (2 níveis) para larvas. Em adultos, consideramos também o efeito sexo (2 níveis). Para encontrarmos o modelo apropriado para explicar a resposta dos predadores em relação aos vários efeitos, nós usamos o teste de chi-quadrado para associação parcial, que avalia a significância de um dado efeito, ou interações entre efeitos, comparando o modelo que inclui todas as interações da mesma ordem com o modelo sem o respectivo efeito. O valor significativo representa que se um dado efeito ou interação entre efeitos é retirado do modelo com as interações da mesma ordem, o modelo apresenta um ajuste pior aos dados (Statistic 7.0, StatSoft, Inc. 2004). Posteriormente selecionamos o melhor modelo, isto é, o conjunto de efeitos, ou interações entre efeitos que melhor representam as respostas dos predadores (Statistic 7.0, StatSoft, Inc. 2004).

Para o bioensaio com os APs *N*-óxidos aplicados topicamente em presas palatáveis de *T. molitor* nós analisamos a percentagem de presas liberadas por *N. clavipes* pelo teste que compara múltiplas proporções de acordo com Zar (2010, p. 557).

## RESULTADOS

### SEQUESTRO E METABOLIZAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Nós verificamos que tanto o tipo estrutural de alcaloide oferecido em dieta, a concentração de APs na dieta e o estágio de desenvolvimento de *U. ornatrix* afeta a quantidade sequestrada destes compostos (Tabela 1, Figura 3). Larvas que se alimentaram em dieta com a platinecina sequestram uma quantidade menor de AP durante toda fase de desenvolvimento em relação às larvas que se alimentaram em dieta contendo monocrotalina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,004$ ) ou retronecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P < 0,001$ ). A quantidade de AP sequestrado aumenta com o aumento da concentração de AP na dieta. O sequestro de APs é 4,5x maior na dieta contendo  $1,2 \times 10^{-1}\%$  de AP em relação a quantidade sequestrada na dieta  $2,4 \times 10^{-2}\%$  (teste *a posteriori* de Tukey,  $P < 0,001$ ) e 30x maior do que na dieta  $4,8 \times 10^{-3}\%$  AP (teste *a posteriori* de Tukey,  $P < 0,001$ ). Nós observamos que os machos de *U. ornatrix* possuem uma quantidade maior de APs do que larvas (teste *a posteriori* de Tukey,  $P < 0,001$ ) e pupas (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,015$ ).

Os três APs incorporados em dieta são sequestrados e metabolizados diferencialmente (Tabela 2, Figuras 4 e 5). Tanto os dados de concentração relativa (Tabela 2), quanto à análise de componentes principais (Figura 5) mostram que a monocrotalina é sequestrada pelas larvas, e transmitida sem alterações para as pupas e adultos, sendo que parte é utilizada na biossíntese do hidroxidanaidal em corematas de machos adultos. A retronecina é sequestrada pela larva em baixa proporção e mantida durante a metamorfose sem alterações. Além disso, grande parte é transformada em creatonotina B e isocreatonotina B. A platinecina também é sequestrada pela larva em baixa proporção e mantida durante a metamorfose sem alterações. Grande parte é transformada nos “insect PAs” creatonotina B,

isocreatonotina B e 1,2-diidrocreatonotina B. Os machos que se alimentaram em dietas com retronecina e platinecina também apresentaram hidroxidanaidal em suas corematas.

DESEMPENHO DE *UTETHEISA ORNATRIX* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TRÊS ALCALOIDES  
PIRROLIZIDÍNICOS

Nós observamos que a sobrevivência, desempenho de larvas, longevidade de machos e fêmeas, fecundidade e fertilidade não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações em  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , para cada AP oferecido em dieta (Tabelas 4A-C e 5A-C).

Quando usamos uma única concentração molar para comparar as mesmas variáveis acima entre os três APs oferecido em dieta, observamos que a sobrevivência não apresentou diferenças significativas (Tabela 6). Entretanto, o tempo de desenvolvimento larval apresentou diferenças significativas entre os três APs (Tabela 6). Larvas que se alimentaram de dieta com platinecina se desenvolveram mais rapidamente até a fase de pupa quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 6). As demais variáveis de desempenho de larvas, longevidade de adultos, fecundidade e fertilidade não apresentaram diferenças significativas (Tabelas 6 e 7). Analisando os índices nutricionais encontramos diferenças significativas entre dietas com diferentes APs (incluindo o controle sem APs) em todos os índices, exceto a TCoR (Tabela 8). Observamos que a TCrR foi significativamente maior em larvas que se alimentaram de dieta contendo o a platinecina em relação a larvas que se alimentaram em dieta com a monocrotalina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,039$ ) e retronecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,024$ ). Larvas que se alimentaram em dieta com a platinecina apresentaram uma TMR significativamente menor que as larvas que se alimentaram em dieta com a monocrotalina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,007$ ) e retronecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,043$ ). O tipo de alcaloide na dieta também afeta a eficiência digestiva e

metabólica. A monocrotalina e a retronecina na dieta reduzem significativamente a ECI de larvas que se alimentam destes alcaloides quando comparadas a larvas que se alimentaram em dieta com a platinecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,006$  e  $P = 0,001$ , respectivamente). Larvas que se alimentaram em dieta com a monocrotalina e retronecina apresentam uma ECD significativamente menor que larvas se alimentando em dieta com a platinecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,004$  e  $P = 0,016$ , respectivamente). Conseqüentemente o CM dessas larvas foi significativamente maior do que aquelas se alimentando com platinecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,004$  e  $P = 0,016$ , respectivamente). A AD do alimento foi maior em larvas que se alimentaram em dieta com a monocrotalina em relação a larvas da dieta controle sem AP (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,010$ ) e retronecina (teste *a posteriori* de Tukey,  $P = 0,013$ ).

DEFESA QUÍMICA EM *UTETHEISA ORNATRIX*: O EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE ALCALOIDES  
PIRROLIZIDÍNICOS EM DIFERENTES PREDADORES

Em relação às larvas e os adultos de *U. ornatix*, a interação entre a espécie do predador e a concentração de APs explicam as respostas dos predadores (Tabelas 8 e 9, respectivamente). Inspeccionando visualmente os fatores que apresentaram significância (Figuras 6A e 6B), podemos afirmar que em relação às larvas: (1) em relação à espécie do predador, a aranha *L. erythrognatha* foi mais eficiente que pintinhos *G. gallus*, predando larvas que se alimentaram de maiores concentrações de APs, (2) em relação aos alcaloides, monocrotalina e retronecina na dieta de larvas, tornaram estas mais protegidas contra predadores do que platinecina, e (3) aumentado à concentração dos alcaloides na dieta das larvas, aumenta-se a proteção contra predadores. Em relação aos adultos de *U. ornatix*, os mesmos padrões foram observados, sendo que a aranha *N. clavipes* foi a predadora mais

eficiente, seguida de *L. erythrognatha* e depois por *G. gallus* (Figura 7 A, B e C).

Observamos que os três predadores usados respondiam de forma similar em relação às larvas e adultos, quando as larvas se alimentaram de dietas com a maior concentração de APs. Em relação a *N. clavipes*, observamos que os adultos de *U. ornatrix* permaneciam imóveis quando eram lançados na teia. A aranha inspecionava a mariposa com o primeiro par de patas e pedipalpos e rapidamente passava a cortar as teias que prendiam a mariposa e esta era liberada ileso. Quando lançávamos as larvas e adultos próximos à aranha *L. erythrognatha*, a mesma aprisionava a mariposa com as quelíceras e esse rápido contato era suficiente para elicitar a resposta de liberação do predador; os indivíduos testados eram liberados ilesos. Observamos também, que logo após este processo a aranha utilizava o primeiro par de patas e os pedipalpos para limpar as quelíceras. Em relação a ave *G. gallus*, as larvas e adultos geralmente foram bicadas uma única vez e não tocadas novamente após o contato inicial. A mariposa não apresentava quaisquer sinais aparentes de perfurações ou extravasamento de fluido corporal. A ave posteriormente utilizava os pés para limpar o bico, ou até mesmo esfregava este no chão e paredes da gaiola onde estavam acondicionados.

Quando testamos 5 APs N-óxidos diferentes contra a aranha *N. clavipes*, além do controle sem APs, observamos que a estrutura do AP ( $\chi^2= 36,979$ ,  $gl= 4$ ,  $P< 0,001$ ) e concentração deste ( $\chi^2= 6,453$   $gl= 1$ ,  $P= 0,011$ ) influencia a resposta de *N. clavipes* (Figura 8). Na concentração de 3,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  *N. clavipes* liberou 100% e 70% das presas tratadas com a monocrotalina N-óxido e o 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de retronecina N-óxido, respectivamente. Somente uma presa foi liberada em 10 testadas para a retronecina N-óxido. Todas as presas tratadas com a platinecina N-óxido e o 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de platinecina N-óxido foram predadas. Para a menor concentração 0,3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , *N. clavipes* liberou 60% das presas tratadas com a monocrotalina N-óxido e somente 10% das presas tratadas com o 9-O-( $\pm$ )-3-metilpentanoato de retronecina N-óxido. Todas as presas tratadas

com retronecina ou platinecina *N*-óxido, 9-O-(±)-3-metilpentanoato de platinecina *N*-óxido e os controles sem APs foram predadas por *N. clavipes*.

## DISCUSSÃO

*Sequestro, metabolismo e transformações bioquímicas de diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos nos diferentes estágios de desenvolvimento de Utetheisa ornatix.*

Nós mostramos neste trabalho que larvas de *U. ornatix* possuem a capacidade de sequestrar diferentes estruturas de alcaloides pirrolizidínicos incorporados em dieta artificial. Os APs sequestrados são armazenados eficientemente e transmitidos durante todo o ciclo de vida da mariposa. Nossos resultados indicam que o tipo estrutural de AP presente na dieta e a concentração deste, bem como o estágio de desenvolvimento afeta a aquisição de alcaloides por uma mariposa especialista. Larvas de *U. ornatix* que se alimentaram em dieta com monocrotalina e retronecina sequestraram uma quantidade maior de alcaloides em relação a larvas que se alimentaram em dieta com a platinecina. Machos possuem uma quantidade maior de APs do que lavas e pupas. Esse resultado pode estar relacionado ao decréscimo no peso seco de larvas (42%) e pupas (25%) quando comparados ao peso seco de machos de *U. ornatix* (resultados não mostrados). Com o aumento da concentração de AP na dieta, o sequestro destes compostos é maior. Do ponto de vista estrutural, o que pode explicar este resultado é a insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico, presente na monocrotalina e retronecina, e ausente na platinecina. APs 1,2 insaturados são mais relevantes do ponto de vista ecológico, em função da atividade deterrente contra predadores e sua utilização na biossíntese de feromônios sexuais de machos (revisão em Macel 2011, Trigo 2011).

Outro aspecto determinante é que estes APs são predominantes em plantas do gênero

*Crotalaria* sp., nas quais *U. ormatrix* é especialista, que caracteriza-se pela presença majoritária de APs macrocíclicos do tipo monocrotalina e senecionina (Flores et al. 2009). Cogni et al. (2012) observaram que adultos que enquanto larva se alimentaram em dieta com maiores concentrações de uma mistura de APs do tipo senecionina (4% de senecionina, 69% de integerrimina e 27%) sequestram uma quantidade maior de alcaloide em relação aqueles que se alimentaram em dieta com menor concentração de AP. Hoina et al. (2012) mostraram que larvas que se alimentaram previamente em dieta contendo baixa concentração de alcaloide sequestram uma pequena quantidade do composto e preferem posteriormente em experimentos de escolha dietas contendo uma quantidade elevada de APs, enquanto aquelas que se alimentaram previamente em dieta contendo elevada concentração de AP sequestram uma quantidade significativamente maior de alcaloide e posteriormente não mostram preferência por dietas contendo diferentes concentrações de APs.

Nós verificamos que os alcaloides da dieta são metabolizados por três mecanismos principais: (1) APs macrocíclicos do tipo monocrotalina são sequestrados pela larva e transmitidos sem alterações para a pupa e adultos e parte é utilizado na biossíntese do hidroxidanaidal; (2) em menores proporções APs que incluem bases necinas de diferentes estruturas são sequestrados pela larva e mantidos durante a metamorfose sem alterações; (3) sequestro, modificações bioquímicas de bases necinas e biossíntese de “insect PAs”, formados pela esterificação de um ácido nécico derivado de aminoácidos do próprio inseto com o AP adquirido da dieta. Parte destes alcaloides característicos de insetos é utilizada diretamente como precursores comuns do hidroxidanaidal (revisão em Hartmann 2009).

O processo pelo qual a monocrotalina é utilizada na biossíntese do feromônio sexual de machos hidroxidanaidal ocorre a partir da aromatização do anel pirrolizidínico do AP, seguido pela hidrólise da ligação éster e subsequente oxidação do álcool benzílico resultante formando o aldeído hidroxidanaidal (Eisner & Meinwald 1995). Este mecanismo foi

confirmado em uma espécie de Arctíneo generalista, *E. acrea*, através da formação do hidroxidanaidal a partir de APs do tipo monocrotalina presentes em *C. pumila* oferecidos em dieta artificial (Hartmann 2003).

O perfil dos APs metabolizados por *U. ornatix* nos diferentes estágios de desenvolvimento revela uma elevada capacidade bioquímica e metabólica em lidar com os diferentes APs da dieta. Devemos destacar a presença de diferentes “insect PAs” que chegam a 90% do total de APs encontrado no inseto. Mas qual a importância funcional desses metabólitos?

Em um primeiro plano, fica evidente que em Arctíneos que sintetizam e emitem o hidroxidanaidal, uma proporção de vários dos APs sequestrados converge para a formação do hidroxidanaidal via creatonotinas como intermediário comum (ver revisão em Schulz 2009). Quando voltamos nossa atenção para a transmissão dos APs sequestrados derivados de planta durante a metamorfose de Arctíneos observamos que certas estruturas que são sequestradas por larvas não podem ser transmitidas sem alterações para o estágio de pupa (Hartmann et al. 2005a, Hartmann et al. 2005b). O AP presente em orquídeas, falaeopsina (base necina traquelantamidina) e o diéster de cadeia aberta sarracina (base necina platinecina) são sequestrados por larvas de *Grammia geneura* e *Estigmene acrea* e antes da transmissão para as pupas são convertidos em alcaloides característicos de insetos. Este mecanismo indica que estes ácidos néricos inseto-específicos atuam como mímicos de ácidos néricos de plantas que são impróprios para a transmissão em diferentes estágios de desenvolvimento. Portanto, esse processo permite a utilização e manutenção de praticamente todos os tipos de bases necinas que do contrário não seriam transmitidas para a fase adulta. A grande especificidade pelo substrato dessa enzima esterificante é responsável por manter uma rota de recuperação, permitindo a insetos adaptados a APs sequestrar qualquer tipo de base necina da planta aumentando seu arsenal de defesa contra predadores (Hartmann, 2009).

Pouco se sabe de outros mecanismos pelo qual *U. ornatix* utiliza um AP de planta para biossíntese do hidroxidanaidal. Nós mostramos pela primeira vez “insect PAs” são utilizados como precursores do feromônio em machos de *U. ornatix*. Esse mecanismo fica claro quando verificamos que a retronecina sequestrada da dieta por larvas é transmitida sem variação na quantidade, excluindo a formação do hidroxidanaidal a partir da mesma. Já a diminuição da abundância da creatonotina B na transição de pupa para machos, reforça a síntese do hidroxidanaidal a partir desta. A platinecina também origina o hidroxidanaidal em machos de *U. ornatix*. Larvas da mariposa primeiramente modificam bioquimicamente a platinecina, introduzindo uma dupla ligação na posição 1,2 do anel pirrolizidínico originando a retronecina. Esta por sua vez é transformada em creatonotina B, e utilizada na biossíntese do hidroxidanaidal em machos. Esta é a primeira observação de que uma mariposa Arctiinae especialista produz hidroxidanaidal a partir de uma base necina AP 1,2 saturada sem esterificação presente na dieta. Este processo foi observado no generalista adaptado a APs *E. acrea* (Hartmann 2005a). Quando alimentados enquanto larva com o AP sarracina, adultos de *E. acrea* contém somente 1,2-diidrocreatonotina B, indicando que estes hidrolisam completamente a sarracina e reesterificam a base necina platinecina com o ácido creatonóico. Análises em CG-MS não detectaram a presença de retronecina ou creatonotinas o que favorece a hipótese de que o “insect PA” 1,2-saturado é o substrato para a aromatização da platinecina e posterior hidrólise para a produção do hidroxidanaidal em machos desta espécie, não a base necina livre.

É importante ressaltar que a platinecina raramente é encontrada sem esterificação nas plantas hospedeiras de *U. ornatix* do gênero *Crotalaria*, mas pode estar esterificada com um ácido senecionóico de 12 membros, representando os APs do tipo senecionina, dentro do subgrupo platifilina, presentes em *Crotalaria breviflora* da secção *Calycinae* (Flores et al. 2009). A abundancia constante da retronecina e platinecina associado ao decréscimo de

creatonotina B de pupas para machos, indica que o hidroxidanaidal originou-se da creatonotina B. Outro ponto que favorece a creatonotina B como único intermediário na biossíntese do hidroxidanaidal em machos é o fato de observarmos que independente do AP na dieta, machos possuem uma quantidade maior de isocreatonotina B quando comparado as demais fases de desenvolvimento, indicando que a mesma não é utilizada na produção do feromônio.

O mecanismo pelo qual o hidroxidanaidal é derivado de um AP presente na planta foi demonstrado inicialmente em *C. transiens*, que enquanto larva recebeu em dieta artificial a heliotrina, um AP O<sup>9</sup>-monoéster. (Schulz et al. 1993, Schulz et al. 1998). Este processo envolve inicialmente a epimerização da configuração 7S da heliotrina para a configuração 7R da epiheliotrina. O próximo passo refere-se à aromatização do anel pirrolizidínico, hidrólise da ligação éster formando a desidroretronecina que é finalmente oxidada produzindo o hidroxidanaidal. Em *E. acrea*, todos os APs de plantas sequestrados são metabolizados especificamente de dois modos: (a) hidrólise da ligação éster e reesterificação da base necina derivada da planta com ácidos nécicos originários do inseto e (b) formação do feromônio sexual de machos hidroxidanaidal. Uma aromatização direta da retronecina livre e posterior oxidação parece pouco provável uma vez que a biossíntese do hidroxidanaidal ocorre em estágios tardios de desenvolvimento (de pupa para adultos) e nesta fase apenas uma quantidade discreta de retronecina livre está disponível. A presença de um AP monoéster pirrólico instável em grande quantidade na fase tardia da pupação concomitante ao hidroxidanaidal em *C. transiens* indica a aromatização da retronecina no estado esterificado (Schulz et al. 1993, Schulz et al. 1998). Outro ponto que favorece essa premissa é a perda significativa de creatonotina em machos de *E. acrea* durante a transição de pupa para adultos (Hartmann 2003, Hartmann 2004, Hartmann 2005a).

Apesar das fortes evidências apontadas no texto do papel de “insect PAs” como

intermediários comuns na biossíntese de hidroxidanaidal, não podemos excluir a possibilidade de que a base necina de APs macrocíclicos do tipo monocrotalina pode ser incorporada em hidroxidanaidal através da retronecina livre seguido da esterificação para creatonotina, do mesmo modo que pode ocorrer a conversão direta de precursores disponíveis como a heliotridina em hidroxidanaidal sem a necessidade de uma base necina livre e “insect PAs” como intermediários na biossíntese deste feromônio (Hartmann et al. 2005a).

Nós observamos uma elevada plasticidade bioquímica e metabólica de *U. ornatrix* em sequestrar APs de diferentes estruturas e este cenário pode ter importantes implicações ecológicas dentro da relação destes compostos com a defesa química nas diferentes fases da ontogenia no que diz respeito a interação com outros níveis tróficos e com a comunicação sexual entre indivíduos da mesma espécie. No Brasil, existem aproximadamente 42 espécies de *Crotalaria*, sendo 31 nativas e 11 introduzidas, que possuem 38 estruturas de APs das mais diversas, agrupadas em diferentes Tipos, Grupos e Subgrupos (Flores et al. 2009). Nesse sentido, é extremamente importante para *U. ornatrix* ter uma capacidade bem elástica relacionada ao sequestro e metabolismo dessas estruturas. A conexão entre química defensiva e comunicação sexual nesta espécie representa um modelo evolutivo muito interessante (Weller et al. 1999). O sistema de acasalamento em *U. ornatrix* é um exemplo clássico de escolha de parceiro pela fêmea para reprodução. A escolha é exclusivamente baseada no sinal enviado pela coremata do macho, uma estrutura glandular reversível coberta com escamas modificadas localizada no abdômen que libera o hidroxidanaidal (Conner & Jordan 2009). Este sinal químico transmite múltiplas mensagens, algumas diretamente relacionadas com presentes nupciais que protegem a fêmea e a prole contra predadores, outras estão relacionadas com “genes melhores” e algumas com a habilidade futura dos descendentes de garantirem o acasalamento. Em outras palavras, quando uma fêmea escolhe um macho com um conteúdo de hidroxidanaidal elevado, ela acessa diretamente a habilidade do macho em

fornecer mais APs e nutrientes, através de um macho e espermatóforo maiores (Eisner e Meinwald, 1995). Do ponto de vista genético, quando uma fêmea copula com machos maiores, seus descendentes carregam estes genes que refletem em uma maior fecundidade e uma taxa de sobrevivência mais elevada (Iyengar et al. 2002b). Adicionalmente, este macho gera descendentes maiores e a prole masculina de machos maiores também serão maiores e terão mais chances de serem escolhidos por fêmeas na próxima geração (Iyengar et al. 2002b).

Uma vez que podemos observar a plasticidade bioquímica de *U. ornatrix* em metabolizar os alcaloides da dieta eficientemente, a próxima questão abordada por nós neste trabalho foi verificar os custos associados ao sequestro destes compostos no desempenho e aptidão em larvas e adultos de *U. ornatrix*.

*Como diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos afetam o desempenho de larvas e adultos de Utetheisa ornatix?*

Poucos estudos até o momento têm demonstrado experimentalmente de maneira adequada se uma substância química de defesa da planta afeta negativamente um herbívoro especialista e se o sequestro desses compostos gera um custo em termos de desempenho para o inseto. Cogni et al. (2012) apontam que as dificuldades metodológicas envolvem primeiramente o isolamento de um composto químico da planta e a variação da concentração deste em uma dieta artificial associado a medidas de parâmetros de desempenho sob condições controladas de laboratório. A outra dificuldade metodológica esta relacionada com a medida dos custos do sequestro desses compostos relacionados com a expressão constitutiva ou induzida da maquinaria metabólica e enzimática para sua detoxificação.

Nesse sentido, para investigarmos os custos associados ao sequestro de diferentes classes estruturais de APs no desempenho e aptidão de *Utetheisa ornatix* modificamos o desenho experimental utilizado por Cogni et al. (2012) usando dois enfoques em relação a concentração de APs. No primeiro enfoque, nós observamos que a sobrevivência, desempenho de larvas, longevidade de machos e fêmeas, fecundidade e fertilidade não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações em  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , para cada AP oferecido em dieta. Nossos resultados corroboram com os observados por Cogni et al. (2012), onde foi demonstrado que o sequestro de APs por *U. ornatix* não implica em um custo negativo expressivo no desempenho de larvas e adultos de modo geral. Estes autores observaram que de todos os parâmetros de desempenho analisados somente o tempo de desenvolvimento larval foi afetado negativamente pela concentração de AP na dieta. Larvas que se alimentaram em dieta contendo 2,4% da massa seca (100x mais AP do que a concentração encontrada em frutos verdes de *C. pallida*) de uma mistura de APs do tipo

senecionina (4% de senecionina, 69% de integerrimina e 27% de retrorsina) cresceram menos, mas em função de um maior tempo de desenvolvimento a massa de pupas não diferiu daquelas que se alimentaram em dieta com menores concentrações do alcaloide. Em consequência, independente da concentração de AP na dieta, não houve diferenças significativas no desempenho de adultos referentes à longevidade de machos e fêmeas, fecundidade e fertilidade dos ovos. Os mesmos resultados foram obtidos até em condições de estresse em laboratório. Os mesmos autores utilizaram qPCR para analisar a expressão e/ou indução do gene que codifica para a enzima utilizada para detoxificar APs, a *PNO*, do inglês, - Pyrrolizidine- alkaloid-N-oxygenase. Os resultados obtidos reforçaram a premissa da ausência de um custo significativo no sequestro dos alcaloides, uma vez que as larvas apresentaram uma elevada indução na expressão do gene da *PNO* nas maiores concentrações de AP na dieta (oito vezes e 41 vezes maior na dieta 0,12% e 2,4%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle) sem um efeito negativo expressivo no desempenho de larvas e adultos de modo geral.

No segundo enfoque, nós verificamos o efeito de diferentes estruturas de APs no desempenho de *U. ornatrix* sob a perspectiva da ecologia nutricional usando uma única concentração molar para comparar as mesmas variáveis acima entre os três APs oferecido em dieta. Nós utilizamos uma dieta artificial onde podemos controlar com precisão os fatores nutricionais qualitativos (natureza química do nutriente) e quantitativos (proporção de alimento convertido em biomassa). Nós manipulamos a composição química da dieta incorporando diferentes estruturas de APs em concentrações molares equivalentes. Alimentamos um grande número de larvas de *U. ornatrix* desde a eclosão até a pupação nessas dietas contendo alcaloides e em uma dieta controle sem AP. Utilizamos um método gravimétrico para analisarmos os parâmetros fisiológicos e nutricionais do consumo e utilização de alimento por *U. ornatrix* e medimos diferentes parâmetros de desempenho de

larvas e adultos da mariposa. Este delineamento é importante, pois atende vários requisitos em estudo desta natureza: 1- Controle e padronização das condições bióticas (nutricionais) e abióticas (temperatura, fotoperíodo e humidade relativa) oferecendo as mesmas condições ideais de crescimento e reprodução para *U. ornatrix*. A padronização com plantas é mais complexa, visto que plantas distintas e diferentes partes da mesma planta podem variar em termos físicos, nutricionais e químicos; 2- Isolamento de um composto químico a ser testado; 3- Modulação da composição química da dieta e variação na estrutura do alcaloide incorporado (relação estrutura/atividade); 4-Análise dos índices nutricionais do consumo e utilização de alimento e dos parâmetros de desempenho em diferentes estágios de desenvolvimento de *U. ornatrix*. Este conjunto de fatores permite investigar com mais clareza a interação entre os fatores nutricionais e APs de plantas e associar estes efeitos com um possível custo em termos de desempenho associado ao sequestro destes compostos para um inseto especialista.

Nós observamos que a sobrevivência de larvas até a fase adulta não apresentou diferenças significativas. Entretanto, o tempo de desenvolvimento larval apresentou diferenças significativas entre os três APs. Larvas que se alimentaram de dieta com platinecina se desenvolveram mais rapidamente até a fase de pupa quando comparado aos demais tratamentos. Em função de um tempo de desenvolvimento maior, larvas que se alimentaram em dieta com monocrotalina e retronecina não diferiram na massa de pupas e adultos quando comparadas aos demais tratamentos. Consequentemente, a longevidade de adultos, fecundidade de fêmeas e fertilidade dos ovos não foram afetadas pelo tipo de AP na. Esses resultados mostram que diferentes concentrações de um mesmo alcaloide não afetam o desempenho de larvas e adultos de *U. ornatrix*, mas que APs com diferentes estruturas em concentrações equimolares apresentam atividade diferenciada na eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatrix*, indicando que pequenas modificações estruturais podem ter um

efeito ecológico distinto no desempenho de um inseto especialista (Macel 2011).

Podemos afirmar que existe uma relação entre os custos em termos de crescimento e reprodução (desempenho) associado ao sequestro de diferentes APs e a eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatrix*. A platinecina afeta a TCrR e as larvas que se alimentaram nessa dieta se desenvolveram mais rápido do que as larvas da dieta com monocrotalina e retronecina, indicando que o ganho de biomassa do inseto em relação à sua massa inicial é afetado. Esse fator está relacionado ao aumento na quantidade de alimento gasto para metabolizar os APs monocrotalina e retronecina da dieta (TMR). Esses resultados são um reflexo da eficiência digestiva e metabólica diferencial de *U. ornatrix* em lidar com os APs da dieta. O decréscimo na ECI e ECD em larvas da dieta monocrotalina e retronecina indica que menos alimento está sendo incorporado e assimilado em biomassa pelo inseto para o crescimento, o que representa um elevado CM, resultante de um aumento na porcentagem do alimento metabolizado em energia para lidar com o AP da dieta. O efeito da monocrotalina na AD das larvas de *U. ornatrix* indica uma atividade enzimática diferencial para a assimilação dos nutrientes do alimento ingerido a partir das paredes do intestino do inseto. Provavelmente, o alimento ingerido permaneceu por mais tempo no tubo digestivo para ser assimilado em relação às larvas da dieta controle e retronecina. Esses resultados indicam que apesar da eficiência maior em assimilar os nutrientes do alimento, as larvas da dieta com monocrotalina são menos eficientes em converter os nutrientes assimilados em biomassa.

Apesar de o único parâmetro afetado ser o tempo de desenvolvimento larval, nossos resultados confirmam que APs 1,2-insaturados são mais tóxicos. É importante destacar que não ocorreram diferenças entre o desempenho da mariposa em dieta com AP em relação ao controle sem alcaloide. A estrutura de APs é importante para sua atividade contra insetos herbívoros, tanto para especialistas como para generalistas. Quanto à forma do AP, assume-se de modo geral a base livre possui uma atividade tóxica e/ou deterrente maior que APs N-

óxidos. Em relação à estrutura, APs macrocíclicos 1,2-insaturados são mais relevantes do ponto de vista ecológico, devido a uma expressiva atividade biológica nas interações multitróficas entre plantas, herbívoros e seus inimigos naturais. Já APs 1,2 saturados e bases necinas sem esterificação são designadas como não tóxicas (Mattocks 1986, Frei et al. 2002, Macel 2011, Trigo 2011).

O nível de especialização em plantas do gênero *Crotalaria* que produzem APs constitutivamente por *U. ornatrix* é altamente elaborado, envolvendo diferentes mecanismos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos para otimização da utilização e sequestro desse recurso na defesa química contra predadores e comunicação sexual (Eisner & Meinwald 1995). Fisiologicamente, larvas de *U. ornatrix* possuem quimiorreceptores bucais e neurônios gustativos que respondem sensível e especificamente a APs de uma maneira dose-dependente, permitindo a detecção destes em diferentes concentrações, elicitando e estimulando a alimentação em APs (Bernays et al. 2003). Fêmeas de *U. ornatrix* são beneficiadas em termos reprodutivos com a aquisição de APs em dieta artificial. Embora as fêmeas que se alimentaram em dieta contendo 0.5% de monocrotalina tiveram uma redução no período de vida não ocorreu uma redução na fecundidade das mesmas quando comparadas aquelas que se alimentaram em dieta sem alcaloide, na verdade, a aquisição de APs induz uma taxa de oviposição mais acelerada (Del Campo et al. 2005).

Estas respostas adaptativas que concernem aspectos fisiológicos, comportamentais e bioquímicos permitem a alimentação em diferentes plantas hospedeiras que possuem concentrações elevadas e diferentes estruturas de APs e conseqüentemente uma maior proteção química contra predadores e maior sucesso reprodutivo sem um efeito negativo no desempenho da mariposa (Cogni et al. 2010, Cogni et al. 2012). Desse modo, *U. ornatrix* pode atuar como agente natural de seleção do nível de defesa química de suas plantas hospedeiras. A plasticidade bioquímica de *U. ornatrix* em lidar com diferentes tipos

estruturais de alcaloides em *Crotalaria* como já discutidos anteriormente é um ponto crucial nesse modelo biológico, uma vez que em termos de Brasil, ocorrem aproximadamente 42 espécies de *Crotalaria*, que possuem em torno de 38 estruturas diferentes de APs, agrupadas em diversos Tipos, Grupos e Subgrupos (Flores et al. 2009).

Nesse sentido, alguns modelos clássicos desse sistema biológico são representados pela interação entre plantas do gênero *Senecio* spp. e o herbívoro especialista *T. jacobaeae*, e generalistas adaptados a APs como *G. geneura* e *E. acrea* (Macel 2011), bem como borboletas danaineas e ithomiíneas e plantas da família *Asteraceae*, *Boraginaceae* e *Apocynaceae*, que contém APs (Trigo 2011). Por exemplo, o desempenho de *T. jacobaeae* medidos em termos de massa da pupa e tempo de desenvolvimento larval não foram afetados pela concentração de APs e o perfil qualitativos destes presentes em 11 populações de *S. jacobaeae* (Macel et al. 2002). Diferentes estruturas de APs atuam de forma diversificada como estimulantes de oviposição em *T. jacobaeae*. Macel e Vrieling (2003) mostraram em bioensaios que os APs isolados de plantas: monocrotalina, senecionina e senecifilina estimulam a oviposição enquanto que os alcaloides retrorsina, serquinquina e heliotrina não são atrativos. Hägele & Rowell-Rahier (2000) utilizando o AP senecifilina N-óxido em dieta artificial verificaram que este não afeta o desempenho da mariposa Arctiinae *Callimorpha dominula* e dos crisomelídeos especialistas *Oreina cacaliae* e *O. speciosissima*. Quando se trata de uma espécie generalista adaptada a APs, podemos observar resultados contrastantes relativos ao efeito destes compostos no desempenho de um inseto, visto que eles utilizam em seu habitat plantas com APs sem propósitos nutricionais e sim a procura de compostos defensivos. Hartmann et al. (2005b) verificaram que larvas de *E. acrea* não sobrevivem quando alimentadas com folhas de *Crotalaria pumila* que possuem APs mas quando criadas em dieta artificial contendo até 2% de monocrotalina não tem a sobrevivência afetada e se desenvolvem normalmente até adultos.

De fato, o balanço entre os custos e benefícios da utilização de plantas contendo APs como recurso alimentar por diferentes insetos herbívoros especialistas e generalistas que por sua vez apresentam níveis de interação variáveis com suas plantas hospedeiras e diferentes mecanismos para lidarem com estes compostos têm contribuído para a evolução, manutenção da concentração e da diversidade de compostos secundários em plantas como os APs (Deprés et al. 2007, Van Der Meijden 1996, Joshi & Vrieling 2005).

Adicionalmente, para ampliarmos nosso conhecimento sobre os aspectos coevolutivos das interações entre insetos e plantas, devemos incluir o entendimento de como as interações inseto-plantas afetam e são afetadas por suas relações com o terceiro nível trófico destes herbívoros, ou seja, inimigos naturais como: predadores, parasitoides e/ou parasitas. Do mesmo modo que as interações entre plantas e herbívoros exercem uma pressão seletiva nos inimigos naturais, estes últimos podem exercer um impacto seletivo recíproco nas interações planta-herbívoros (Price et al. 1980).

Portanto, o próximo objetivo deste trabalho foi investigar o papel ecológico de APs e seus metabólitos em *U. ornatrix* na defesa química contra potenciais predadores vertebrados e invertebrados.

*Diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos defendendo quimicamente Utetheisa ornatrix em diferentes fases de desenvolvimento contra diferentes predadores.*

Apesar do sequestro de metabólitos secundários de plantas de modo geral estar bem documentado em algumas espécies de Arctíneos (Weller et al. 1999) ainda se faz necessário para um melhor entendimento do papel destes compostos na defesa química contra predadores trabalhos que tenham um desenho experimental que verifique a eficiência dos compostos sequestrados contra inimigos naturais combinado a uma detalhada análise química.

Várias forças ecológicas e evolutivas distintas podem atuar em diferentes estágios de vida de um inseto. Larvas geralmente são mais predadas por invertebrados e estão mais suscetíveis ao ataque de parasitoides, adultos são presas em potencial para pássaros e morcegos, pupas que permanecem no solo são frequentemente predadas por roedores (revisão em Bowers 1992, 1993). Por isso é importante à elaboração de um experimento onde ocorra a variação no espectro de impalatabilidade de uma presa, através da modulação da concentração de um composto químico a ser testado em dieta artificial associado à variação do espectro de predadores em potencial da presa estudada para entender melhor os mecanismos que mediam estas interações (Nishida et al. 2002).

Para atender a estes requerimentos nós realizamos neste trabalho um desenho experimental que procurou preencher as lacunas de estudos anteriores. Inicialmente, utilizamos uma variedade de classes estruturais de APs isolados de plantas ou semissintetizados em laboratório manipulando a concentração destes em dieta. Para investigarmos como diferentes APs em diferentes concentrações consumidos por larvas de *U. ornatrix* influenciam a defesa contra predadores tanto de larvas quanto de adultos realizamos bioensaios com predadores invertebrados: -as aranhas *Nephila clavipes* (Nephilidae) e *Lycosa erythrognatha* (Lycosidae), e predadores vertebrados: -pintinhos *Gallus gallus domesticus*

(Phasianidae).

Nós realizamos uma análise química detalhada que nos permitiu medir a quantidade de APs sequestrados e analisar o perfil qualitativo do metabolismo e processamento bioquímico destes nas diferentes fases de ontogenia de *U. ornatix*. Desse modo, podemos associar a concentração e estrutura do AP metabolizado pelo inseto com a atividade anti-predação. Adicionalmente, para verificar eventuais diferenças na estrutura/atividade destes APs metabolizados, realizamos bioensaios de predação com os APs purificados *N*-óxido utilizando larvas palatáveis de *T. molitor*. Este espectro de predadores foi escolhido em função do grande número de trabalhos descritos na literatura e da história natural dessa interação presa-predador (revisão em Eisner 2003, Conner & Jordan 2009 para as aranhas e Nogueira-de-Sá & Trigo 2005 e Massuda & Trigo 2009 para *G. gallus*) o que possibilita uma discussão mais elaborada dos resultados obtidos neste trabalho com os de outros pesquisadores dentro deste modelo.

Nós mostramos que a defesa química de *U. ornatix* nas diferentes fases de desenvolvimento contra diferentes predadores é influenciada tanto pelo tipo estrutural de AP e a concentração dos alcaloides na dieta, bem como a força de predação exercida. Larvas e adultos são protegidos igualmente e o sexo não influencia na defesa contra predação. A presença e a concentração de APs nos tecidos de larvas e adultos de *U. ornatix* são determinantes para a defesa química contra os predadores utilizados. Alguns autores já demonstraram que APs são responsáveis pela defesa contra predação em *U. ornatix* (revisões em Eisner & Meinwald 1995, Conner & Jordan 2009, Trigo 2011). Adultos que enquanto larva se alimentaram em frutos de *C. pallida* foram mais protegidos contra a aranha *N. clavipes* em relação a adultos que se alimentaram em folhas da planta hospedeira enquanto larva. Esta diferença na defesa química está relacionada com a maior concentração de APs em adultos provenientes da alimentação em frutos, que possuem uma quantidade maior de AP

do que as folhas (Ferro et al. 2006). Os resultados de Silva & Trigo (2002) confirmaram essa dose-atividade de APs. Estes autores testaram a atividade de diferentes APs aplicados topicamente em presas palatáveis em diferentes concentrações e observaram uma relação positiva entre a concentração de AP e a resposta de liberação de *N. clavipes*.

Este é o primeiro trabalho que mostra que o tipo de AP sequestrado e metabolizado influencia a defesa química de um herbívoro especialista de um modo dose-dependente. Nós verificamos que a monocrotalina e retronecina da dieta das larvas, tornaram estas e os adultos mais protegidos contra predadores do que a platinecina. Esse resultado está fortemente relacionado à quantidade de AP encontrado em larvas e adultos que se alimentaram destes alcaloides, que é maior do que o total de APs sequestrados por larvas e adultos da dieta platinecina. Associado ao fator concentração de APs, é importante destacar o metabolismo destes e sua relação com a defesa química contra predação. Nesse sentido, mostramos que a monocrotalina da dieta é o único alcaloide transmitido sem alterações pela larva até a fase adulta. Outros autores já verificaram o papel da monocrotalina na defesa química de *U. ornatix*. Eisner (1982) testou a impalatabilidade de adultos de *U. ornatix* contra *N. clavipes* alimentados enquanto larva em uma dieta a base de feijão sem APs e de adultos que enquanto larva se alimentaram na mesma dieta onde 10% do conteúdo do feijão era repostado por sementes de *C. spectabilis*, que contem monocrotalina. A maioria dos adultos contendo APs foi rejeitada e todos os adultos testados sem APs foram predados. Testes posteriores com APs purificados provaram que estes compostos são os responsáveis pela deterrencia contra a aranha. Larvas de *Tenebrio molitor* contendo uma solução de monocrotalina pura em forma de cristal aplicada topicamente foram substancialmente mais liberadas por *N. clavipes* em relação às larvas controle sem APs. Este trabalho demonstrou experimentalmente pela primeira vez que APs estavam envolvidos na defesa química de um inseto com coloração de advertência. Testes em laboratório e em campo demonstraram que larvas e adultos de *U.*

*ornatrix* são protegidos pela aquisição de APs contra a aranha *Lycosa ceratiola* (Lycosidae). Eisner e Eisner (1991) mostraram que larvas e adultos coletados no campo e criados em dieta artificial contendo sementes de *C. spectabilis* são rejeitados pela aranha sem sinais de injúrias, enquanto que larvas e adultos criados em dieta artificial sem AP foram predados. Dados químicos revelaram a presença significativa de monocrotalina em larvas (152 µg) e adultos (630 µg). Adultos que se alimentaram enquanto larva em folhas e sementes de *C. spectabilis* foram rejeitados pelo morcego insetívoro *Eptesicus fuscus* (Vespertilionidae) quando comparados com adultos alimentados em dieta sem AP enquanto larvas (Hristov & Conner 2005).

Com relação aos demais APs presentes na dieta e a atividade contra predação em larvas e adultos de *U. ornatix*, devemos destacar a metabolização das diferentes bases necinas presentes na dieta em dois “insect PAs” predominante em larvas, pupas e adultos independente do AP da dieta, a creatonotina B (majoritário) e isocreatonotina B. Estes alcaloides de insetos chegam a 90% do total de APs sequestrados em indivíduos da dieta retronecina e 50-70% do total de APs presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento de *U. ornatix* que se alimentaram em dieta com a platinecina. Em concentrações menores, cerca de 23%, identificamos a 1,2-diidrocreatonotina B, em larvas, pupas e adultos da dieta platinecina. Estes alcaloides se mantêm durante a metamorfose e do ponto de vista funcional, esta plasticidade bioquímica é importante, pois parte destes compostos é utilizada na biossíntese do hidroxidanaidol por machos. Entretanto, estas não podem ser as únicas funções de “insect PAs” porque Arctíneos como *T. jacobaeae* e *G. geneura*, que não emitem feromônios derivados de APs, são capazes de sintetizar alcaloides característicos de insetos, e estes compostos também são encontrados em fêmeas (Hartmann et al. 1990 e Hartmann et al. 2005b). Nós também identificamos diferentes estruturas de “insect PAs” presente nas fêmeas de *U. ornatix*. Nesse sentido, a respeito das funções destes alcaloides, uma questão crucial

emerge em meio a este cenário: Qual o papel ecológico de “insect PAs” na defesa química de Arctíneos contra predadores?

Do ponto de vista estrutural, a creatonotina B e isocreatonotina B são ésteres de alcaloides inseto-específicos da base retronecina que possui uma insaturação 1,2 no anel pirrolizidínico, com um ácido nécico do inseto na posição C9 e C7, respectivamente. A 1,2-diidrocreattonotina B, difere da creatonotina B somente pela ausência da insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico da platinecina.

Quando pensamos em APs e sua toxicidade de modo geral, é importante relembrarmos que essa toxicidade é restrita a bioativação metabólica de APs 1,2-insaturados resultando em intermediários pirrólicos (desidropirrolizinas) responsáveis pelos efeitos já conhecidos em vertebrados e insetos não adaptados a APs, como toxicidade celular, mutagenicidade e genotoxicidade (Mattocks 1986, Frei et al. 1992, Macel 2011, Trigo 2011). A atividade biológica de APs saturados ainda não está clara e precisa ser investigada. Até o momento, somente um estudo apresenta evidências de um efeito deterrente contra insetos e atividade antifúngica de APs saturados presentes em *Heliotropium floridum* (Boraginaceae) (Reina et al. 1997).

Nesse sentido, nós adotamos outro mecanismo determinante para comprovar e investigar a atividade destes compostos relacionados à estrutura e eficácia contra diferentes predadores: o isolamento, síntese e N-oxidação de alguns dos APs metabolizados por *U. ornatrix* e de dois análogos de “insect PAs”. Estes alcaloides foram aplicados topicamente em organismos palatáveis para posterior avaliação da resposta contra *N. clavipes* em bioensaios anti-predação. Nós observamos que a estrutura do AP metabolizado por *U. ornatrix* e a concentração deste influencia a resposta de *N. clavipes* contra predação. Na concentração de 3,0 µg/mg *N. clavipes* liberou 100% e 70% das presas tratadas com a monocrotalina N-óxido e o 9-O-(±)-3-metilpentanoato de retronecina N-óxido,

respectivamente. Somente 10% das presas testadas foram liberadas para a Retronecina *N*-óxido. Todas as presas tratadas com a platinecina *N*-óxido e o 9-O-(±)-3-metilpentanoato de platinecina *N*-óxido foram predadas por *N. clavipes*. Para a menor concentração 0,3 µg/mg, *N. clavipes* liberou 60% das presas tratadas com a monocrotalina *N*-óxido e somente 10% das presas tratadas com o 9-O-(±)-3-metilpentanoato de retronocina *N*-óxido. Todas as presas tratadas com os demais APs foram predadas por *N. clavipes*. Martins et al. 2015 (submetido) mostraram que adultos de *U. ornatrix* que enquanto larvas se alimentaram de folhas e sementes de *C. vitelina* possuem em seus tecidos exclusivamente uma mistura de “insect PAs”, são protegidos quimicamente contra predação por *N. clavipes*. Adicionalmente, estes autores demonstraram que a mistura de Creatonotina B/Isocreatonotina B *N*-óxido aplicadas topicamente em presas palatáveis foram 100% eficazes na proteção contra predação por *N. clavipes*, em concentrações similares as encontradas nos adultos. Esses resultados indicam que a 1,2 insaturação do anel pirrolizidínico associada à função éster em APs são determinantes na defesa química contra predação e corroboram com a hipótese inicialmente sugerida por Dreyer et al. (1985) e Mattocks (1986) de que essas características em APs podem ser cruciais para a atividade biológica destes compostos. Silva & Trigo (2002) observaram um padrão semelhante e mostraram que a atividade deterrente de APs contra *Nephila* depende da estrutura e da dose oferecida. Estes autores observaram aspectos importantes neste trabalho: 1- Uma mistura de APs diésteres macrocíclicos *N*-óxido (89:11, Integerrimina:Senecionina) foi mais eficiente que a respectiva base livre e os demais APs testados; 2- Calimorfina, um alcaloide característico de inseto, na forma de base livre, apresentou atividade deterrente e 3- retronocina base livre e *N*-óxido foram ineficazes quanto a atividade anti-predação.

Nós mostramos neste trabalho as primeiras evidências experimentais da importância funcional destes alcaloides característicos de insetos na defesa química contra predadores em

Arctíneos. Em outras palavras, a convergência em *U. ornatix* de diferentes APs em “insect PAs” otimiza o arsenal de defesa deste inseto contra predadores vertebrados e invertebrados.

Quando voltamos nossa atenção para a interação entre um predador e sua presa, seja o primeiro vertebrado ou invertebrado, precisamos entender que este sistema envolve vários aspectos, dentre eles, sensoriais, fisiológicos, bioquímicos, toxicológicos, de aprendizagem e comportamento dos predadores, e no caso da presa, aspectos evolutivos da impalatabilidade, aposematismo e mimetismo (Nishida 2002). No sistema estudado neste trabalho, podemos verificar que o comportamento de rejeição dos nossos modelos de predadores utilizados em relação a larvas e adultos de *U. ornatix*, caracterizou-se por uma breve inspeção inicial através de contato e rápida liberação da presa sem injúrias aparentes (mordidas ou bicadas). O que nos leva a pergunta: Como a aquisição desses alcaloides pode explicar que diferentes predadores se comportem de modo semelhante ao rejeitarem larvas e adultos de *U. ornatix*? Esta relação pode ser explicada por dois fatores: (1) a toxicidade de APs associada a um sabor amargo característico de compostos nocivos de insetos que possuem a capacidade de irritar, envenenar e/ou intoxicar um predador (Brower 1984) e (2) a capacidade de *U. ornatix* em incorporar os APs sequestrados em tecidos periféricos enquanto larva e até mesmo nas escamas das asas de adultos, onde a concentração de AP pode chegar a 2% do total sequestrado pela mariposa (Rossini et al. 2001, 2003). O fato de *U. ornatix* ser recoberta com uma camada de APs deterrente a predadores em potencial é uma resposta adaptativa que explica o seu comportamento incomum de permanecer imóvel ao ser atacada por diferentes predadores. Essa vantagem advém do fato de que este revestimento químico em larvas e adultos envia uma mensagem do sabor desagradável da presa a vários quimiorreceptores que o predador utiliza durante a inspeção inicial (Rossini et al. 2003).

Especificamente, o sequestro de APs por insetos herbívoros pode ser visualizado evolutivamente como uma estratégia adaptativa para estes se armarem quimicamente com

defesas pré-fabricadas e, portanto, relativamente de baixo custo (Nishida 2002). Esta estratégia adaptativa confere a estes insetos uma dupla vantagem em termos de colonização de um nicho bioquimicamente pouco utilizado e a garantia de exploração deste arsenal fitoquímico, visto que devido às propriedades tóxicas destes compostos, as plantas que os contem são evitadas por insetos e mamíferos herbívoros (Bernays 1994). Esse mecanismo pode levar a um melhor desempenho de uma determinada espécie, devido ao aumento populacional em função da baixa predação e conseqüentemente um decréscimo na aptidão da planta em função de um investimento maior na produção de compostos químicos defensivos.

Portanto, o que devemos deixar claro, é que o caminho evolutivo percorrido por insetos desde sua alimentação em uma planta contendo AP até a aquisição de impalatabilidade contra predadores é um processo bastante complexo, regido por diferentes pressões seletivas, onde cada uma destas pode envolver o paradigma custos/benefícios de caráter fisiológico e ecológico (Macel 2011). Outras importantes variáveis destes fatores de interação intrínsecas nesse sistema multitrófico podem ser relacionadas com a abundância de plantas tóxicas como recurso alimentar e a variação quantitativa e qualitativa do perfil químico destas, bem como a competição intra- e interespecífica por um determinado recurso, a variação do espectro de predadores e abundância de presas alternativas no ecossistema (Nishida 2002).

## CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho podemos estabelecer uma conexão entre o sequestro e metabolismo de diferentes estruturas de APs incorporados em dieta artificial e o efeito no desempenho e na química defensiva de larvas e adultos de *U. ornatrix* contra diferentes forças seletivas de predação. Nossos resultados mostraram que a mariposa *U. ornatrix* sequestra e transmite diferentes estruturas de APs de uma forma metabolicamente estável durante toda a metamorfose, e possui um metabolismo eficiente que permite a transformação, convergência e o armazenamento desses compostos em tecidos estratégicos que conferiram proteção química contra predadores vertebrados e invertebrados e a sua utilização na comunicação sexual por machos.

Podemos concluir que o tipo estrutural de AP presente na dieta e a concentração deste, afetam a aquisição de alcaloides por *U. ornatrix*. A quantidade de AP sequestrado aumenta com o aumento da concentração de AP na dieta e larvas que se alimentaram em dieta contendo APs com uma insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico (monocrotalina e retronecina) sequestraram uma quantidade maior de alcaloide em relação a larvas que se alimentaram em dieta com a platinecina (sem a insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico), indicando que APs com essa característica são mais relevantes do ponto de vista ecológico e preferencialmente sequestrados, visto que apresentam atividade tóxica e/ou deterrente contra predadores e são utilizados como precursores do feromônio hidroxidanaidal em machos.

Nossos resultados mostraram que *U. ornatrix* possui uma elevada plasticidade bioquímica e metabólica no processamento dos alcaloides da dieta e podemos concluir que três mecanismos principais regem o sequestro desses compostos pela mariposa: (1) o AP macrocíclico monocrotalina foi sequestrado pela larva e transmitido sem alterações para a pupa e adultos e parte foi utilizado na biossíntese do hidroxidanaidal; (2) em menores

proporções APs que incluem bases necinas de diferentes estruturas foram sequestrados pela larva e mantidos durante a metamorfose sem alterações; (3) sequestro, modificações bioquímicas de bases necinas e biossíntese de “insect PAs”, que foram utilizados diretamente como precursores comuns do hidroxidanaidial.

Nós verificamos que diferentes concentrações de um mesmo alcaloide não afetaram o desempenho de larvas e adultos de *U. ornatix*, mas que APs com diferentes estruturas em concentrações molares equivalentes apresentaram atividade diferenciada na eficiência digestiva e metabólica de *U. ornatix*, indicando que pequenas modificações estruturais em APs podem ter um efeito ecológico distinto no desempenho de um inseto especialista que esta relacionado aos parâmetros nutricionais e fisiológicos do consumo e utilização do alimento.

Finalmente, nós mostramos pela primeira vez evidências experimentais de que a estrutura e a concentração do AP sequestrado e metabolizado por um herbívoro especialista influencia a defesa química de uma maneira dose-dependente contra diferentes predadores. Novamente, APs com a insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico (monocrotalina e retronecina) presentes na dieta tornaram larvas e adultos da mariposa mais protegidos contra predadores vertebrados e invertebrados do que a platinecina (sem a insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico). Esse resultado está fortemente relacionado à quantidade de AP sequestrado por larvas e adultos que se alimentaram destes alcaloides, que foi maior do que o total de APs sequestrados por larvas e adultos da dieta platinecina. Portanto, podemos concluir que a presença e a concentração de APs nos tecidos de larvas e adultos de *U. ornatix* são determinantes para a defesa química contra os predadores utilizados.

No entanto, podemos concluir que este resultado não pode ser separado do efeito do metabolismo e transformações bioquímicas dos APs da dieta, ou seja, da relação estrutura/atividade dos APs metabolizados e a defesa química em *U. ornatix*. Nesse sentido, nós verificamos pela primeira vez a importância funcional de “insect PAs” na atividade anti-

predação em arctíneos Neotropicais. Os resultados dos bioensaios de predação com larvas e adultos de *U. ornatrix* e com presas palatáveis tratadas com os principais APs metabolizados pela mariposa na forma de *N*-óxido evidenciaram que alcaloides característicos de insetos com a insaturação 1,2 do anel pirrolizidínico associado a função éster em APs são determinantes na defesa química contra predação. Em outras palavras, a convergência metabólica em *U. ornatrix* de diferentes APs em “insect PAs” otimiza o arsenal de defesa deste inseto contra predadores vertebrados e invertebrados.

## REFERÊNCIAS

- Aplin RT, Benn MH, Rothschild M (1968) Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature* 219: 747-748.
- Aplin RT, Rothschild M (1972) Poisonous alkaloids in the body tissue of the garden tiger moth (*Arctia caja* L.) (Lepidoptera) and the cinnabar moth (*Tyria jacobaeae* L.). In: De Vries A, Kochva E (eds.) *Toxins of animal and plant origin*. Gordon & Breach Science Publication, New York, pp 579-595.
- Berenbaum MR, Zangerl AR (1993) Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance. *Oecologia* 95: 370-375.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman & Hall, New York, New York.
- Bernays EA, Chapman RF, Lamunyon CW, Hartmann T (2003) Taste receptors for pyrrolizidine alkaloids in a monophagous caterpillar. *J Chem Ecol* 29: 1709-1722.
- Bezzerrides A, Eisner T (2002) Apportionment of nuptial alkaloidal gifts by a multiply-mated female moth (*Utetheisa ornatrix*): eggs individually receive alkaloid from more than one male source. *Chemoecology*. 12: 213-218.
- Biller A, Boppré M, Witte L, Hartmann T (1994) Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*: chemical and chemoecological aspects. *Phytochemistry* 35: 615-619.
- Boppré M (1990) Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids: Exemplification of complexity. *J Chem Ecol* 16: 165-185.
- Bowers MD (1992) The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects. In: Roitberg B, Isman MB (eds) *Chemical ecology of insects: An evolutionary approach*, New York, Chapman & Hall, pp. 216-244.
- Bowers MD (1993) Aposematic caterpillars: life-styles of the warningly colored and

- unpalatable. In: Stamp NE, Casey TM (eds) Caterpillars, New York, Chapman & Hall, pp. 331-371.
- Brower LP (1984) Chemical defence in butterflies. In: Vane-Wright RI, Ackery PR (eds) The biology of butterflies, London, Academic Press, pp. 109-134.
- Chen T, Mei N, Fu PP (2010) Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J Appl Toxicol* 30: 183-196.
- Cogni R (2010) Resistance to plant invasion? A native specialist herbivore shows preference for and higher fitness on an introduced host. *Biotropica* 42: 188-193.
- Cogni R, Futuyma DJ (2009) Local adaptation in an insect plant interaction depends on the spatial scale. *Biol J Linn Soc* 97: 494-502.
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ (2011) Varying herbivore population structure correlates with lack of local adaptation in a geographic variable plant-herbivore interaction. *PLoS One* 6: e29220.
- Cogni R, Trigo JR, Futuyma DJ (2012) A free lunch? No cost for acquiring defensive plant pyrrolizidine alkaloids in a specialist arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Mol Ecol* 21: 6152-6162.
- Conner WE, Jordan AT (2009) From armaments to ornaments: the relationship between chemical defense and sex in Tiger moths. In: Conner WE (ed) Tiger moths and woolly bears. behaviour, ecology, and evolution of the Arctiidae. Oxford University Press, NY, pp 155-172.
- Conner WE, Weller SJ (2004) A quest for alkaloids: the curious relationship of tiger moths and plants containing pyrrolizidine alkaloids. In: Cardé RT, Millar JG (eds) Advances in insect chemical ecology. Cambridge University Press, New York

- Culvenor CC, Edgar JA, Jago MV, Qutteridge A, Peterson JE, Smith LW (1976) Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chem Biol Interac* 12: 299-324.
- Culvenor CCJ, Smith LW (1961) The alkaloids of *Crotalaria goreensis*: 7 $\beta$ -hydroxy-1-methylene-8- $\beta$  and 7 $\beta$ -hydroxy-1-methylene-8 $\alpha$ -pyrrolizidine. *Aust J Chem* 14: 284-294.
- Del Campo ML, Smedley SR, Eisner T (2005) Reproductive benefits derived from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13508-13512.
- Després L, David JP, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22: 298-307.
- Dobler S, Rowell-Rahier M (1996) Reproductive biology of viviparous and oviparous species of the leaf beetle genus *Oreina*. *Entomol Exp Appl* 80: 375-388.
- Domínguez DM, Reina M, Santos-Guerra A, Santana O, Agulló T, López-Balboa C, Gonzalez-Coloma A (2008) Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. *Biochem Syst Ecol* 36: 153-166.
- Donohoe TJ, Guillermin JB, Walter DS (2002) Preparation of (+)-nemorensic acid and approaches to nemorensine using the partial reduction of electron deficient furans. *J Chem Soc Perkins Trans 1* 11: 1369-1375.
- Dreyer DL, Jones KC, Molyneux RJ (1985) Feeding deterency of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. *J Chem Ecol* 11: 1045-1051.
- Edgar JA, Culvenor CCJ, Cockrum PA, Smith LW (1980) Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth "metabolite". *Tetrahedron Lett* 21: 1383-1384.

- Edgar JA, Molyneux RJ, Colegate SM (2015) Pyrrolizidine alkaloids: Potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver diseases. *Chem Res Toxicol* 28: 4-20.
- Eisner T (2003) *For love of insects*. Harvard University Press, Cambridge.
- Eisner T, Eisner M (1991) Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid containing moth, *Utetheisa ornatrix*, and its larva, to wolf spiders. *Psyche* 98: 111-118.
- Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 50-55.
- Eisner T, Meinwald J (2003) Alkaloid-derived pheromones and sexual selection in Lepidoptera. In Blomquist GJ, Vogt RG (ed) *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*. Academic Press, Florida. pp. 341-368.
- Eisner T. (1982). *For love of nature: Exploration and discovery at biological stations*. *Bioscience* 32: 321-326.
- Ferro VG, Guimarães, PR, Trigo JR (2006) Why do larvae of *Utetheisa ornatrix* penetrate and feed in pods of *Crotalaria* species? Larval performance vs. chemical and physical constraints. *Entomol Exp Appl* 121:23-29.
- Fletcher MT, McKenzie RA, Blaney BJ, Reichmann KG (2009) Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria* Taxa from Northern Australia: Risk to Grazing Livestock. *J Agric Food Chem* 59: 311-319.
- Flores AS, Tozzi AMGA, Trigo JR (2009) Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: chemotaxonomic significance. *Biochem Syst Ecol* 37: 459-469.
- Foelix RF (2011). *Biology of spiders*. 3<sup>rd</sup> Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Fordyce JA, Nice CC (2008) Antagonistic, stage-specific selection on defensive chemical sequestration in a toxic butterfly. *Evolution* 62: 1610-1617.
- Frei H, Luthy J, Brauchli J, Zweifel U, Wurgler FE, Schlatter C (1992) Structure/activity

- relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem Biol Interact* 83: 1-22.
- Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW (2004) Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev* 36: 1-55.
- Glendinning JI (2002) How do herbivorous insects cope with noxious secondary. Glendinning, J. I. 2002. How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? *Entomol Exp Appl* 104: 15-25.
- González A, Rossini C, Eisner M, Eisner T (1999) Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5570-5574.
- Gonzalez-Coloma A, Reina M, Gutiérrez C, Fraga, BM (2002) Natural insecticides, structure diversity, effects, structureactivity relationships. A case study. In: Atta-Ur-Rahman (Ed.) *Studies in natural products chemistry. Bioactive Natural Products*, vol. 26. Elsevier, Amsterdam, pp. 849-879.
- Hagele BF, Rowell-Rahier M (2000) Choice, performance and heritability of performance of specialist and generalist insect herbivores towards cacalol and seneciphylline, two allelochemicals of *Adenostyles alpina* (Asteraceae). *J Evol Biol* 13: 131-142.
- Hartmann T (2009) Pyrrolizidine alkaloids: The successful adoption of a plant chemical defense. In: Conner WE (ed) *Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae*, Oxford University Press, New York, pp 55-81.
- Hartmann T, Toppel G (1987) Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 26:1639-1643.
- Hartmann T, Biller A, Witte L, Ernst L, Boppré M (1990) Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera).

- Biochem Syst Ecol 18: 549-554.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Ernst L, Singer MS, Bernays EA (2004) Acquired and partially *de novo* synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. J Chem Ecol 30: 229-254.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays EA, Singer MS (2005a) Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. Insect Biochem Mol Biol 35: 1083-1099.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer MS, Bernays EA (2005b) Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. Insect Biochem Mol Biol 35: 391-411.
- Hoina A, Martins CHZ, Trigo JR, Cogni R (2013) Preference for high concentrations of plant pyrrolizidine alkaloids in the specialist arctiid moth *Utetheisa ornatrix* depends on previous experience. Arthropod Plant Interact 7:169-175.
- Holloway GJ, de Jong P, Brakefield PM, de Vos H (1991) Chemical defense in ladybird beetles (Coccinellidae). I. Distribution of coccinelline and individual variation in defense in 7-spot ladybirds (*Coccinella septempunctata*). Chemoecology 2: 7-14.
- Holloway GJ, de Jong PW, Ottenheim M (1993) The genetics and cost of chemical defense in the 2-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.). Evolution 47: 1229-1239.
- Hovermale JT, Fleming F, Morrie Craig A (1990) Improved labelling methods for C9-<sup>2</sup>H-retronecine. Heterocycles 38: 135-142
- Hristov NI, Conner WE (2005) Effectiveness of tiger moth (Lepidoptera, Arctiidae) chemical defense against an insectivorous bat (*Eptesicus fuscus*). Chemoecology 15: 105-113.
- Huan JY, Miranda CL, Buhler DR, Cheeke PR (1998) The roles of CYP3A and CYP2B isoforms in hepatic bioactivation and detoxification of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in sheep and hamsters. Toxicol App Pharmacol 151: 229-235.

- Iyengar VK, Eisner T (2002a) Parental body mass as a determinant of egg size and egg output in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *J Insect Behav* 15: 309-318.
- Iyengar VK, Reeve HE, Eisner T (2002b) Paternal inheritance of a female moth's mating preference. *Nature* 419: 830-832.
- Joshi J, Vrieling K (2005) The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. *Ecol Lett* 8: 704-714.
- Karban R, Agrawal AA (2002) Herbivore offense. *Annu Rev Ecol Syst* 33: 641-664.
- Klitzke CF, Trigo JR (2000) New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects. Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. *Biochem Syst Ecol* 28: 313-318.
- Koricheva J (2002) Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defenses. *Ecology* 83: 176-190.
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, Hartmann T (1997) The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur J Biochem* 245: 626-636.
- Longson CG, Joss JMP (2006) Optimal toxicity in animals: predicting the optimal level of chemical defenses. *Funct Ecol* 20: 731-735.
- Macel M (2011) Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochem Rev* 10: 75-82.
- Macel M, Klinkhamer PGL, Vrieling K et al (2002) Diversity of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species does not affect the specialist herbivore *Tyria jacobaeae*. *Oecologia* 133: 541-550.
- Macel M, Vrieling K (2003) Pyrrolizidine alkaloids as oviposition stimulants for the cinnabar moth *Tyria jacobaeae*. *J Chem Ecol* 29:1435-1446

- Marascuilo LA, Busk PL (1987) Loglinear models: A way to study main effects and interactions for multidimensional contingency tables with categorical data. *J Counsel Psychol* 34: 443-455.
- Marín-Loaiza JC, Ernst L, Beuerle T, Theuring C, Céspedes CL, Hartmann T. (2008) Pyrrolizidine alkaloids of the endemic Mexican genus *Pittocaulon* and assignment of stereoisomeric 1,2-saturated necine bases. *Phytochemistry* 69: 154-167.
- Massuda KF, Trigo JR (2009) Chemical defence of the warningly coloured *Methona themisto* caterpillar (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Eur J Entomol* 106: 253-259.
- Mattocks AR (1986) Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London, Academic Press.
- McCullagh P, Nelder JA (1989) Generalized linear models. 2<sup>nd</sup> Ed. Chapman and Hall, London.
- Miller JS, Feeny P (1993) Effects of benzyloisoquinoline alkaloids on the larvae of polyphagous Lepidoptera. *Oecologia* 58:332-339.
- Narberhaus I, Zintgraf V, Dobler S (2005) Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels. Evidence for toxic and deterrent effect on phytophages and predators. *Chemoecology* 15: 121-125.
- Naumann C, Hartmann T, Ober D (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6085-6090.
- Nishida R (2002) Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 47: 57-92.
- Nogueira-de-Sá F, Trigo JR (2005) Faecal shield of the tortoise beetle *Plagiometriona flavescens* (Chrysomelidae: Cassidinae) as chemically mediated defence against

- predators. *J Trop Ecol* 21: 189-194.
- Opitz SEW, Müller C (2009) Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* 19: 117-154.
- Pasteels JM, Hartmann T (2004) Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in *Oreina* and *Platyphora* leaf-beetles: Physiological, ecological and evolutionary aspects. In: Jolivet P, Santiago-Blay JA, Schmitt M (Eds.) *New developments in the biology of Chrysomelidae*. SPB, The Hague, pp. 677-691.
- Polhill RM (1982) *Crotalaria* in Africa and Madagascar. AA Balkema, Rotterdam.
- Price PW, Bouton CE, Gross P, McPheron BA, Thompson JN, Weis AE (1980) Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annu Rev Ecol Sys.* 11: 41-65.
- Reina M, González CA, Gutiérrez C, Cabrera R, Henríquez J, Villarroel L (1997). Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium floridum*. *Phytochemistry* 46: 845-853.
- Reinhard A, Martina J, von der Ohe W, Kempf M, Theuring C, Hartmann T, Schreier P, Beuerle T (2009) Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol* 35: 1086-1095.
- Robinson MH, Mirick H. (1971) The predatory behavior of the golden-web spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae). *Psyche* 78 123-139.
- Rossini C, Bezzerides A, González A, Eisner M, Eisner T (2003) Chemical defense: incorporation of diet derived pyrrolizidine alkaloid into the integumental scales of a moth (*Utetheisa ornatix*). *Chemoecology* 13: 199-205.
- Rossini C, González A, Eisner T (2001) Fate of an alkaloidal nuptial gift in the moth *Utetheisa ornatix*: systemic allocation for defense of self by the receiving female. *Insect Physiol* 47: 639-647.

- Schoonhoven LM, Jermy T, van Loon, JJA (1998) Insect-plant biology: from physiology to evolution. Chapman & Hall, London. 409p.
- Schulz S (2009) Alkaloid-derived male courtship pheromones. In: Conner WE (ed) Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae, Oxford University Press, New York, pp 145-153.
- Schulz S, Beccaloni G, Brown KS, Boppré M, Freitas AVL, Ockenfels P, Trigo JR (2004). Semiochemicals derived from pyrrolizidine alkaloids in male ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Biochem Syst Ecol* 32: 699-713.
- Schulz S, Francke W, Boppré M, Eisner T, Meinwald J (1993) Insect pheromone biosynthesis: stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6834-6838.
- Scriber, J. M., and F. Slansky. 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annu Rev Entomol* 26: 183-211.
- Sehlmeyer S, Wang L, Langel D, Heckel DG, Mohagheghi H, Petschenka G, Ober D (2010) Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the arctiids (Lepidoptera). *PLoS One* 5: e10435.
- Siciliano T; de Leo M; Bader A; de Tommasi N, Vrieling K; Braca A; Morelli I (2005) Pyrrolizidine alkaloids from *Anchusa strigosa* and their antifeedant activity. *Phytochemistry* 66: 1593-1600
- Signoretto AGC, Nava DE, Bento JMS, Parra JRP (2008) Biology and thermal requirements of *Utetheisa ornatrix* (L.) (Lepidoptera: Arctiidae) reared on artificial diet. *Braz Arch Biol Technol* 51: 647-653.
- Silva KL, Trigo JR (2002) Structure-activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. *J Chem Ecol* 28:

637-648.

- Simpson SJ, Raubenheimer, D (1996) Feeding behaviour, sensory physiology and nutritional feedback: an integrative model. *Entomol Exp Appl* 80: 55-64.
- Slansky F, Scriber JM (1982) Selected bibliography and summary of quantitative food utilization by immature insects. *Entomol Soc Amer Bul* 28: 43-55.
- Statsoft, Inc. 2004. Statistica (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Thompson JN (1988) Evolutionary ecology of relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomol Exp Appl* 47: 3-14.
- Travassos L (1946) Contribuição ao conhecimento dos 'Arctiidae'. XI. Gênero '*Utetheisa*' Hübner, 1819. Verificação de '*U. pulchella*' (L., 1758) Kirby, 1892, no Nordeste do Brasil. *Rev Bras Biol* 6: 343-354.
- Trigo JR (2011) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem Rev* 10: 83-98.
- Trigo JR, Brown KS, Henriques S, Barata LES (1996) Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in ithomiinae butterflies. *Biochem Syst Ecol* 24: 181-188.
- Trigo JR, Leal IR, Matzenbacher NI, Lewinsohn TM (2003) Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 31: 1011-1022.
- Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Barata LES (1993) Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *J Chem Ecol* 19: 669-679.
- Van der Meijden E (1996) Plant defense, an evolutionary dilemma: contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomol Exp Appl* 80: 307-310.
- Vasconcellos-Neto J, Lewinsohn TM (1984) Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. *Ecol Entomol* 9:

337-344.

Waldbauer GP (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Adv Insect Physiol* 5: 229-288.

Waldbauer GP, Friedman S (1991) Self-selection of optimal diets by insects. *Annu Rev Entomol* 36: 43-63.

Weller SJ, Jacobson NL, Conner WE (1999) The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Biol J Linn Soc* 68: 557-578.

Wink M, Schneider D (1988) Carrier-mediated uptake of pyrrolizidine alkaloids in larvae of the aposematic and alkaloid-exploiting moth *Cretonotos*. *Naturwissenschaften* 75: 524-225.

Winter CK, Segall HJ (1989) Metabolism of pyrrolizidine alkaloids. In: Cheeke, P.R. (Ed.), *Toxicants of plant origin*, vol. 1. CRS Press, Boca Raton, pp. 23-40.

Witte L, Ehmke A, Hartmann T (1990) Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids; from plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften* 77: 540-543.

Witte L, Rubico C, Bacch P, Hartmann T (1993) Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry* 32: 187-196.

Zalkow LH, Glinsli JA, Gelbaum L, Fleischmann TJ, McGowan LS, Gordon, MM (1985) Synthesis of pyrrolizidine alkaloids indicine, intermedine, lycopsamine, and analogues and their N-oxides. Potential antitumor agents. *J Med Chem* 28: 687-694

Zar JH (2010). *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup> edition, Upper Saddle River. New Jersey.

Tabela 1. Resultado da ANOVA de 3 fatores para comparar as concentrações de alcaloides pirrolizidínicos sequestrados por *Utetheisa ornatix* em relação às diferentes estruturas de APs em diferentes concentrações nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Fonte da Variação	gl	F	P
AP	2	78,390	< 0.001
Concentração	2	712,830	< 0.001
Estágio de desenvolvimento	3	37,471	< 0.001
AP x Concentração	4	39,703	< 0.001
AP x Estágio de desenvolvimento	6	6,650	< 0.001
Concentração x Estágio de desenvolvimento	6	19,001	< 0.001
AP x Concentração x Estágio de desenvolvimento	12	3,831	< 0.001
Resíduo	324		

Tabela 2. Abundância relativa (%) dos alcaloides pirrolizidínicos sequestrados e transformados bioquimicamente por *Utetheisa ornatrix* que enquanto larva se alimentou em dieta contendo 0,12% de diferentes estruturas de alcaloides pirrolizidínicos nas diferentes fases de desenvolvimento, após extração, identificação e caracterização por CG-MS.

Alcaloide detectado no inseto	IR	Alcaloide incorporado na dieta											
		Monocrotalina				Retronecina				Platinecina			
		Larva	Pupa	Macho	Fêmea	Larva	Pupa	Macho	Fêmea	Larva	Pupa	Macho	Fêmea
Retronecina	1478	-	-	-	-	9,1±0,7	8,9±1,1	8,5±0,6	9,2±0,8	10,1±0,6	6,5±0,6	7,9±0,6	7,6±0,3
Platinecina	1521	-	-	-	-	-	-	-	-	7,81±0,7	6,2±0,5	7,9±0,1	6,6±0,2
Isocreatonotina B	2028	-	-	-	-	21,6±0,7	20,8±0,9	29,5±0,6	19,3±0,6	15,5±1,1	16,9±0,6	19,5±0,5	17,2±0,6
Creatonotina B	20247	-	-	-	-	69,3±0,8	70,3±1,1	62±1,2	71,5±1,4	40,1±1,8	47,5±1,6	41,9±0,2	46,8±0,7

Alcaloide detectado no inseto	IR	Alcaloide incorporado na dieta											
		Monocrotalina				Retronecina				Platinecina			
		Larva	Pupa	Macho	Fêmea	Larva	Pupa	Macho	Fêmea	Larva	Pupa	Macho	Fêmea
Monocrotalina	2084	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2- Diidrocreatonotina B	2099	-	-	-	-	-	-	-	-	26,5±1,0	22,9±0,4	22,8±0,3	21,8±0,8

Tabela 3. Padrão de fragmentação (EM-IE) e Índice de retenção (IR) dos Alcaloides pirrolizidínicos metabolizados e transformados bioquimicamente por *Utetheisa ornatix* nos diferentes estágios de desenvolvimento que enquanto larva se alimentou em dieta contendo 0,12% de diferentes estruturas de alcaloides pirrolizidínicos e dos análogos de “insect PAs” sintetizados em laboratório.

Alcaloides pirrolizidínicos	IR	<i>m/z</i> (%)	Referências
Hidroxidanaidal	1456	[M <sup>+</sup> ] 151 (100), 150 (27), 134 (32), 123 (63), 122 (36), 106 (18), 105 (21), 104 (26), 95 (61), 94 (52), 80 (17), 79 (18), 78 (12), 77 (14), 66 (15), 39 (21)	Schulz et al. (2004)
Retronecina	1478	[M <sup>+</sup> ] 155 (23), 111 (60), 94 (17), 80 (100)	Flores et al. (2009)
Platinecina	1521	[M <sup>+</sup> ] 157 (12), 113 (20), 83 (6), 82 (100)	Marín-Loaiza et al. (2008)
Isocreatonotina B	2028	[M <sup>+</sup> ] 269 (3), 251 (16), 138 (78), 137 (24), 136 (20), 124 (18), 120 (31), 111 (64), 106 (55), 94 (39), 80 (100)	Hartmann et al. (2004)
Creatonotina B	2047	[M <sup>+</sup> ] 269 (1), 225 (4), 139 (10), 138 (100), 137 (10), 136 (8), 120 (4), 95 (5), 94 (29), 93 (67), 80 (13)	Hartmann et al. (2004)
Monocrotalina	2084	[M <sup>+</sup> ] 325 (1), 254 (3), 236 (46), 136 (52), 120 (100), 119 (56), 93 (38), 80 (19)	Flores et al. (2009)
1,2-Diidrocreatonotina B	2099	[M <sup>+</sup> ] 271 (3), 210 (11), 171 (25), 140 (27), 139 (8), 114 (10), 96 (38), 95 (64), 82 (100), 55 (24)	Hartmann et al. (2005a)

Alcaloides pirrolizidínicos	IR	<i>m/z</i> (%)	Referências
9-O-(±)-3-Metilpentanoato de retronecina	2156	[M <sup>+</sup> ] 253 (1), 155 (19), 138 (37), 137 (21), 136 (14), 94 (28), 93 (100), 80 (17)	Sintetizado pela primeira vez nesse trabalho
9-O-(±)-3-Metilpentanoato de platinecina	2216	[M <sup>+</sup> ] 255 (1), 237 (13), 155 (15), 140 (21), 138 (6), 96 (26), 95 (100), 82(84), 55 (13)	Sintetizado pela primeira vez nesse trabalho

Tabela 4. Efeito nas medidas de desempenho em *Utetheisa ornatrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial contendo monocrotalina (A), retronecina (B) e platinecina (C), em diferentes concentrações, desde a eclosão até a pupação. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão seguidos do tamanho amostral entre parêntesis.

A.

Medidas de desempenho	Concentração de monocrotalina na dieta (%)				Estatística
	0,0	$4,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	
Sobrevivência (%)	43,04 (99)	41,30 (95)	46,52 (107)	49,13 (113)	Comparações entre proporções, $\chi^2 = 3,426$ , gl = 3, P = 0,489
Dieta consumida (mg)*	$450,01 \pm 8,67$	$441,86 \pm 10,7$	$448,27 \pm 25$	$454,11 \pm 9,74$	Anova de um fator, $F_{3,197} = 1,470$ , P = 0,224
Massa larval (mg)*	$89,36 \pm 4,46$	$90,70 \pm 5,38$	$93,50 \pm 7,16$	$89,41 \pm 5,03$	Anova de um fator, $F_{3,197} = 0,590$ , P = 0,622
Tempo de desenvolvimento larval (dias)*	$42,02 \pm 1,49$	$41,31 \pm 1,21$	$42,36 \pm 1,58$	$42,68 \pm 1,09$	Anova de um fator, $F_{3,197} = 0,920$ , P = 0,434
Massa da pupa (mg)*	$90,74 \pm 4,5$	$91,77 \pm 5,43$	$95,83 \pm 6,59$	$89,51 \pm 5,93$	Anova de um fator, $F_{3,197} = 1,146$ , P = 0,331
Massa de adultos (mg)*	$82,78 \pm 4,22$	$81,82 \pm 5,14$	$86,01 \pm 6,55$	$81,67 \pm 4,31$	Anova de um fator, $F_{3,197} = 0,775$ , P = 0,509

\* Tamanho amostral = 50 indivíduos

## B.

Medidas de desempenho	Concentração de retronecina na dieta (%)				Estatística
	0,0	$4,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	
Sobrevivência (%)*	47,78 (43)	43,33 (39)	51,11 (46)	54,44 (49)	Comparações entre proporções, $\chi^2 = 2,434$ , gl = 3, P = 0,487
Dieta consumida (mg)	$410,01 \pm 10,52$	$414,06 \pm 13,27$	$408,29 \pm 12,35$	$422,59 \pm 23,95$	Anova de um fator, $F_{3,138} = 0,950$ , P = 0,417
Massa larval (mg)	$110,72 \pm 6,66$	$113,39 \pm 7,80$	$117,68 \pm 8,83$	$120,20 \pm 11,10$	Anova de um fator, $F_{3,138} = 0,966$ , P = 0,410
Tempo de desenvolvimento larval (dias)	$32,02 \pm 1,10$	$31,66 \pm 0,96$	$32,40 \pm 1,00$	$31,27 \pm 1,68$	Anova de um fator, $F_{3,138} = 0,820$ , P = 0,482
Massa da pupa (mg)	$111,90 \pm 6,80$	$114,87 \pm 7,73$	$119,02 \pm 8,89$	$121,83 \pm 10,97$	Anova de um fator, $F_{3,138} = 1,045$ , P = 0,374
Massa de adultos (mg)	$105,08 \pm 6,70$	$106,66 \pm 6,69$	$111,16 \pm 7,84$	$113,98 \pm 8,43$	Anova de um fator, $F_{3,138} = 1,092$ , P = 0,354

\* Número de larvas que sobreviveram e foram utilizadas para medir os parâmetros de desempenho entre parêntesis

C.

Medidas de desempenho	Concentração de platinecina na dieta (%)				Estatística
	0,0	$4,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	
Sobrevivência (%)*	46,67 (28)	43,33 (26)	51,67 (31)	36,67 (22)	Comparações entre proporções, $\chi^2 = 2,883$ , gl = 3, P = 0,409
Dieta consumida (mg)	$409,79 \pm 16,16$	$438,68 \pm 12,35$	$408,05 \pm 15,76$	$411,28 \pm 13,28$	Anova de um fator, $F_{3,103} = 2,518$ , P = 0,062
Massa larval (mg)	$109,59 \pm 10,24$	$107,65 \pm 10,38$	$114,41 \pm 11,74$	$104,53 \pm 5,78$	Anova de um fator, $F_{3,103} = 0,664$ , P = 0,576
Tempo de desenvolvimento larval (dias)	$31,50 \pm 1,05$	$32,61 \pm 1,45$	$31,48 \pm 1,24$	$32,72 \pm 1,03$	Anova de um fator, $F_{3,103} = 0,843$ , P = 0,473
Massa da pupa (mg)	$111,49 \pm 10,35$	$110,0 \pm 9,89$	$114,17 \pm 11,31$	$103,87 \pm 5,90$	Anova de um fator, $F_{3,103} = 0,504$ , P = 0,680
Massa de adultos (mg)	$104,63 \pm 9,69$	$101,12 \pm 8,26$	$102,94 \pm 9,26$	$97,69 \pm 5,43$	Anova de um fator, $F_{3,103} = 0,299$ , P = 0,826

\* Número de larvas que sobreviveram e foram utilizadas para medir os parâmetros de desempenho entre parêntesis

Tabela 5. Desempenho de adultos de *Utetheisa ornatrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial monocrotalina (A), retronecina (B) e platinecina (C), em diferentes concentrações, desde a eclosão até a pupação. Após a emergência os adultos foram divididos em 3 tratamentos no qual um macho e uma fêmea foram pareados (n=16). Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão.

A.

Medidas de desempenho	Casais em dieta com monocrotalina			Estatística
	0,0	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	
Longevidade de fêmeas (dias)	$21,80 \pm 1,21$	$23,05 \pm 1,29$	$24,15 \pm 1,31$	Anova de um fator, $F_{2,57} = 1,668$ P = 0,197
Longevidade de machos (dias)	$24,10 \pm 1,19$	$24,55 \pm 1,38$	$23,60 \pm 1,79$	Anova de um fator, $F_{2,57} = 0,204$ P = 0,815
Fecundidade (número de ovos)	$126,25 \pm 4,80$	$131,7 \pm 6,59$	$136,75 \pm 7,62$	Anova de um fator, $F_{2,57} = 0,850$ , P = 0,434
Fertilidade (% de ovos que eclodiram)	$82,35 \pm 1,48$	$82,08 \pm 1,82$	$83,00 \pm 2,20$	Anova de um fator, $F_{2,57} = 0,170$ , P = 0,845

B.

Medidas de desempenho	Casais em dieta com retronecina			Estatística
	0,0	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	
Longevidade de fêmeas (dias)	$21,80 \pm 1,21$	$22,81 \pm 1,40$	$20,75 \pm 0,98$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 1,132$ , $P = 0,330$
Longevidade de machos (dias)	$24,10 \pm 1,19$	$25,06 \pm 1,26$	$23,87 \pm 1,02$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 0,465$ , $P = 0,630$
Fecundidade (número de ovos)	$126,25 \pm 4,80$	$120,00 \pm 8,39$	$124,43 \pm 6,57$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 0,670$ , $P = 0,517$
Fertilidade (% de ovos que eclodiram)	$82,35 \pm 1,48$	$81,26 \pm 1,72$	$84,20 \pm 1,01$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 1,530$ , $P = 0,225$

C.

Medidas de desempenho	Casais em dieta com platinecina			Estatística
	0,0	$2,4 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	
Longevidade de fêmeas (dias)	$21,80 \pm 1,21$	$21,81 \pm 1,46$	$20,50 \pm 0,73$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 0,665$ , $P = 0,518$
Longevidade de machos (dias)	$24,10 \pm 1,19$	$23,93 \pm 1,43$	$22,87 \pm 0,93$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 0,506$ , $P = 0,606$
Fecundidade (número de ovos)	$126,25 \pm 4,80$	$117,25 \pm 6,72$	$115,12 \pm 5,89$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 2,090$ , $P = 0,134$
Fertilidade (% de ovos que eclodiram)	$82,35 \pm 1,48$	$80,01 \pm 2,26$	$83,29 \pm 2,15$	Anova de um fator, $F_{2,49} = 1,290$ , $P = 0,285$

Tabela 6. Efeito nas medidas de desempenho em *Utetheisa ornatrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos em concentrações molares equivalentes desde a eclosão até a pupação. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão seguidos do tamanho amostral entre parêntesis.

Medidas de desempenho	Alcaloides pirrolizidínicos incorporados em dieta [ $2,94 \times 10^{-4}$ mol]				Estatística
	Controle	Monocrotalina	Retronecina	Platinecina	
Sobrevivência (%)*	44,44 (40)	45,55 (38)	42,22 (38)	46,66 (42)	Comparações entre proporções, $\chi^2 = 0,393$ , gl = 3, P = 0,941
Dieta consumida (mg)	422,31 $\pm$ 5,28 (40)	423,14 $\pm$ 8,75 (38)	431,31 $\pm$ 9,55 (38)	436,23 $\pm$ 9,23 (42)	Anova de um fator, $F_{3,157} = 1,880$ , P = 0,135
Peso larval (mg)	117,28 $\pm$ 5,48 (40)	118,53 $\pm$ 4,94 (38)	120,77 $\pm$ 5,52 (38)	126,74 $\pm$ 5,16 (42)	Anova de um fator, $F_{3,157} = 2,613$ , P = 0,053
Tempo de desenvolvimento larval (dias)	30,47 $\pm$ 1,20 (40)	32,17 $\pm$ 1,11 (38)	32,05 $\pm$ 1,30 (38)	27,61 $\pm$ 0,91 (42)	Anova de um fator, $F_{3,157} = 14,230$ , P < 0,001
Peso da pupa (mg)	117,39 $\pm$ 4,74 (40)	118,91 $\pm$ 5,34 (38)	123,35 $\pm$ 4,84 (38)	125,63 $\pm$ 4,96 (42)	Anova de um fator, $F_{3,157} = 2,406$ , P = 0,069
Peso de adultos (mg)	112,84 $\pm$ 5,28(40)	105,87 $\pm$ 4,76 (38)	111,28 $\pm$ 5,25 (38)	117,30 $\pm$ 4,90 (42)	Anova de um fator, $F_{3,157} = 2,516$ , P = 0,060

\*Tamanho amostral entre parêntesis

Tabela 7. Desempenho de adultos de *Utetheisa ornatrix* cujas larvas foram alimentadas em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos em concentrações molares equivalentes desde a eclosão até a pupação. Após a emergência os adultos foram divididos em 4 tratamentos no qual um macho e uma fêmea foram pareados (n=16). Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão.

Medidas de desempenho	Alcaloides pirrolizidínicos incorporados em dieta [ $2,94 \times 10^{-4}$ mol]				Estatística
	Controle	Monocrotalina	Retronecina	Platinecina	
Longevidade de adultos (dias)	23,72 $\pm$ 1,33	24,17 $\pm$ 1,06	25,01 $\pm$ 1,23	25,57 $\pm$ 1,19	Anova de um fator, $F_{3,157} = 1,996$ , $P = 0,116$
Fecundidade (número de ovos)	119,52 $\pm$ 5,89	125,40 $\pm$ 5,93	121,16 $\pm$ 4,46	113,00 $\pm$ 4,70	Anova de um fator, $F_{3,72} = 1,560$ , $P = 0,206$
Fertilidade (% de ovos que eclodiram)	82,27 $\pm$ 3,00	83,13 $\pm$ 6,08	84,74 $\pm$ 2,55	81,63 $\pm$ 5,02	Anova de um fator, $F_{3,72} = 0,573$ , $P = 0,634$

Tabela 8. Efeito nos parâmetros fisiológicos e nutricionais do consumo e utilização de alimento por larvas de *Utetheisa ornatatrix* alimentadas em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos em concentrações molares equivalentes desde a eclosão até a pupação. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão seguidos do tamanho amostral entre parêntesis.

Índices Nutricionais	Alcaloides pirrolizidínicos incorporados em dieta [ $2,94 \times 10^{-4}$ mol]				Estatística
	Controle (28)	Monocrotalina (34)	Retronecina (31)	Platinecina (22)	
TCoR (mg/mg/dia)	2,77 $\pm$ 0,08 (28)	2,73 $\pm$ 0,06 (34)	2,76 $\pm$ 0,08 (31)	2,67 $\pm$ 0,10 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 0,710$ , $P = 0,548$
TCrR (mg/mg/dia)	1,14 $\pm$ 0,04 (28)	1,07 $\pm$ 0,03 (34)	1,06 $\pm$ 0,03 (31)	1,16 $\pm$ 0,04 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 4,304$ , $P = 0,006$
TMR (mg/mg/dia)	6,23 $\pm$ 0,63 (28)	7,24 $\pm$ 0,56 (34)	6,85 $\pm$ 0,48 (31)	5,59 $\pm$ 0,36 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 4,281$ , $P = 0,007$
ECI (%)	41,35 $\pm$ 1,79 (28)	39,11 $\pm$ 1,31 (34)	38,84 $\pm$ 1,34 (31)	43,62 $\pm$ 1,00 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 5,775$ , $P = 0,001$
ECD (%)	55,89 $\pm$ 2,74 (28)	51,08 $\pm$ 2,11 (34)	52,29 $\pm$ 1,95 (31)	58,17 $\pm$ 1,70 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 5,233$ , $P = 0,002$
AD (%)	74,26 $\pm$ 1,11 (28)	76,90 $\pm$ 1,14 (34)	74,40 $\pm$ 1,00 (31)	75,13 $\pm$ 0,80 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 4,440$ , $P = 0,005$
CM (%)	44,11 $\pm$ 2,74 (28)	48,92 $\pm$ 2,11 (34)	47,71 $\pm$ 1,95 (31)	41,83 $\pm$ 1,67 (22)	Anova de um fator, $F_{3,110} = 5,233$ , $P = 0,002$

TCoR: taxa de consumo relativo, TCrR: taxa de crescimento relativo, TMR: taxa metabólica relativa, ECI: eficiência de conversão do alimento ingerido, ECD: eficiência de conversão do alimento digerido, AD: digestibilidade aproximada e CM: custo metabólico.

Tabela 9. Resultado do teste de qui-quadrado para associação parcial entre os vários efeitos que podem explicar a resposta de predadores em relação a larvas de *Utetheisa ornatrix* que se alimentaram em dieta com diferentes concentrações de diferentes alcaloides pirrolizidínicos.

Fonte de Variação	gl	$\chi^2$ para Associação Parcial	P
Predador	1	0,000	1,000
AP	3	0,000	1,000
Concentração	3	0,000	1,000
Resposta	1	12,449	< 0,001
Predador x AP	3	0,669	0,880
Predador x Concentração	3	8,782	0,032
Predador x Resposta	1	15,161	< 0,001
AP x Concentração	9	9,951	0,354
AP x Resposta	3	17,001	0,001
Concentração x Resposta	3	244,847	< 0,001
Predador x AP x Concentração	9	1,368	0,998
Predador x AP x Resposta	3	2,324	0,508
Predador x Concentração x Resposta	3	3,347	0,341
AP x Concentração x Resposta	9	6,178	0,722

Tabela 10. Resultado do teste de qui-quadrado para associação parcial entre os vários efeitos que podem explicar a resposta de predadores em relação a machos e fêmeas adultos de *Utetheisa ornatrix*, cujas larvas se alimentaram em dieta artificial contendo diferentes estruturas de alcaloides pirrolizidínicos (APs) em diferentes concentrações.

Fonte de Variação	gl	$\chi^2$ para Associação Parcial	P
Predador	2	0,000	1,000
AP	3	0,000	1,000
Concentração	3	0,000	1,000
Sexo	1	0,000	1,000
Resposta	1	104,873	<0,001
Predador x AP	6	3,263	0,775
Predador x Concentração	6	57,788	< 0,001
Predador x Sexo	2	0,009	0,996
Predador x Resposta	2	126,771	< 0,001
AP x Concentração	9	13,882	0,127
AP x Sexo	3	0,002	1,000
AP x Resposta	3	29,794	< 0,001
Concentração x Sexo	3	0,036	0,998
Concentração x Resposta	3	579,836	< 0,001
Sexo x Resposta	1	0,076	0,783
Predador x AP x Concentração	18	17,347	0,499
Predador x AP x Sexo	6	0,102	1,000
Predador x AP x Resposta	6	9,225	0,161
Predador x Concentração x Sexo	6	0,025	1,000
Predador x Concentração x Resposta	6	46,902	< 0,001
Predador x Sexo x Resposta	2	0,092	0,955
AP x Concentração x Sexo	9	0,387	1,000

AP x Concentração x Resposta	9	15,622	0,075
AP x Sexo x Resposta	3	0,792	0,851
Concentração x Sexo x Resposta	3	0,01 0	1,000
Predador x AP x Concentração x Sexo	18	0,168	1,000
Predador x AP x Concentração x Resposta	18	8,845	0,963
Predador x AP x Sexo x Resposta	6	0,303	0,999
Predador x Concentração x Sexo x Resposta	6	0,399	0,999
AP x Concentração x Sexo x Resposta	9	0,502	1,000

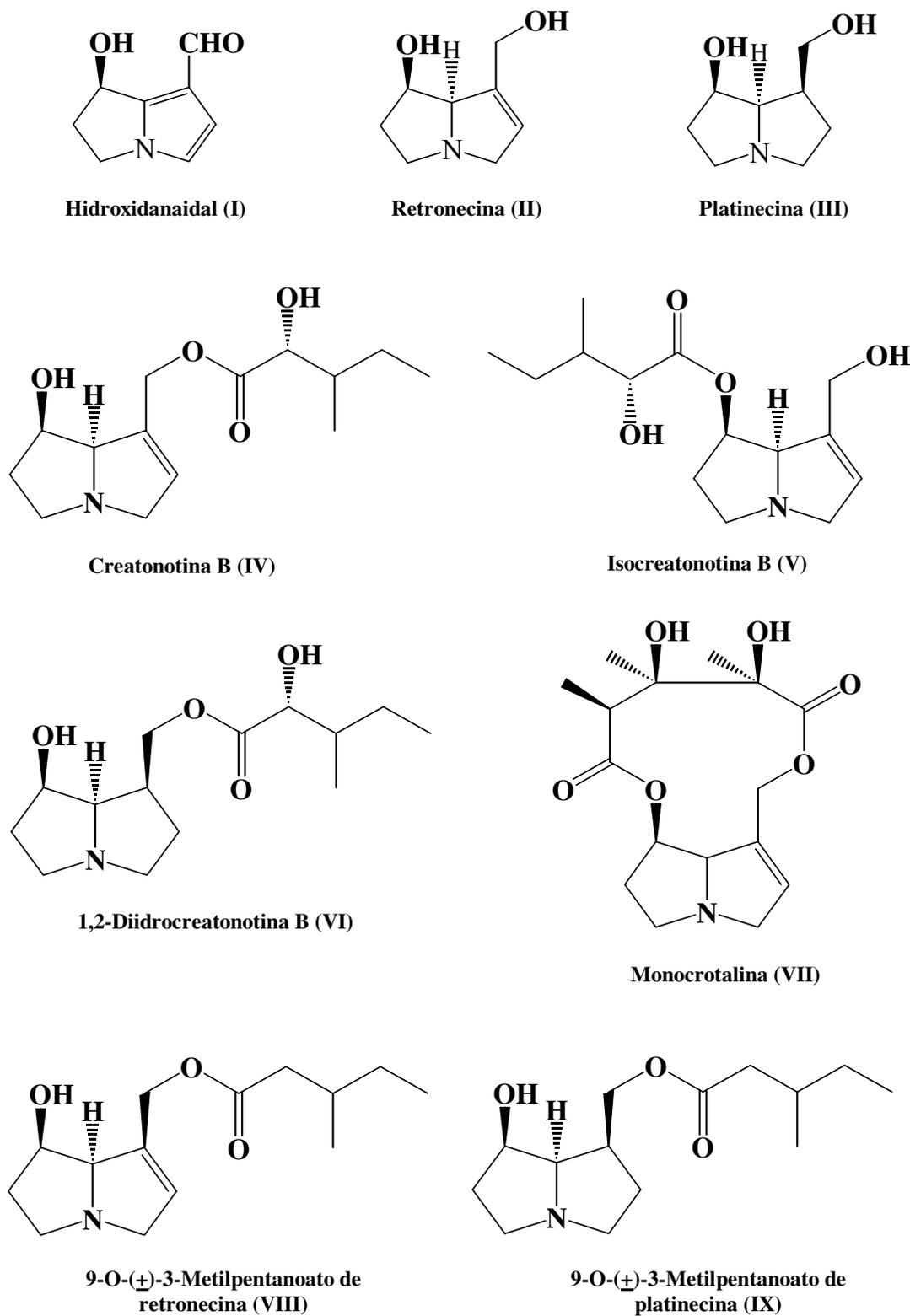


Figura 1. Alcaloides pirrolizidínicos e seus derivados



C



D



E



F





Figura 2. Estágios de desenvolvimento de *Utetheisa ornatrix*. (A) Ovos, (B) larva de 5º instar se alimentado em folhas de *Crotalaria ochroleuca*, (C) macho - visão dorsal, (D) macho - visão ventral, (E) fêmea - visão dorsal, (F) fêmea - visão ventral, e (G) fêmea ovipondo em flor de *Crotalaria ochroleuca*.

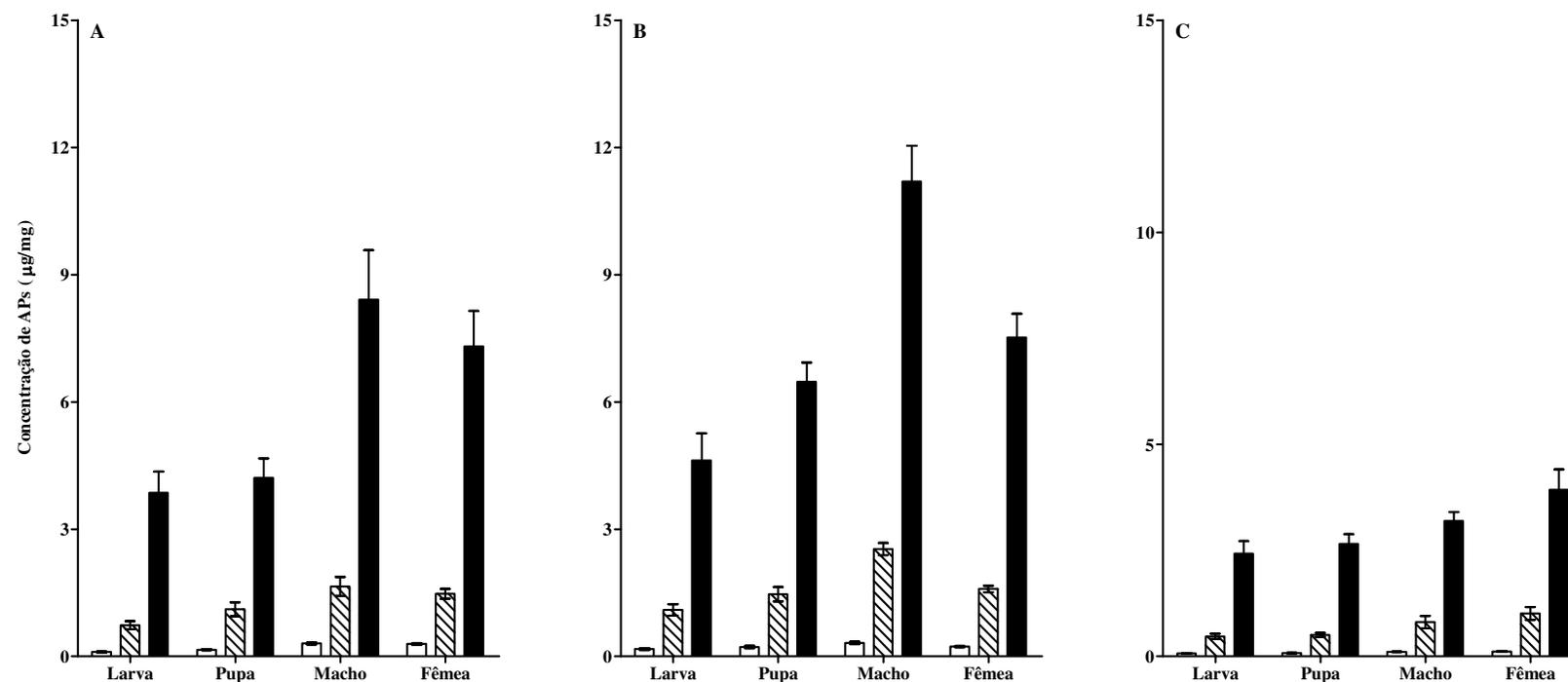


Figura 3. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos ( $\mu\text{g/mg}$  de massa seca) nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Utetheisa ornatix* que enquanto larva se alimentou em dieta artificial contendo diferentes alcaloides pirrolizidínicos (A. monocrotalina, B. retronecina, C. platinecina), em diferentes concentrações (branco =  $4,8 \times 10^{-3}\%$ , listrado =  $2,4 \times 10^{-2}\%$  e preto =  $1,2 \times 10^{-1}\%$ ).

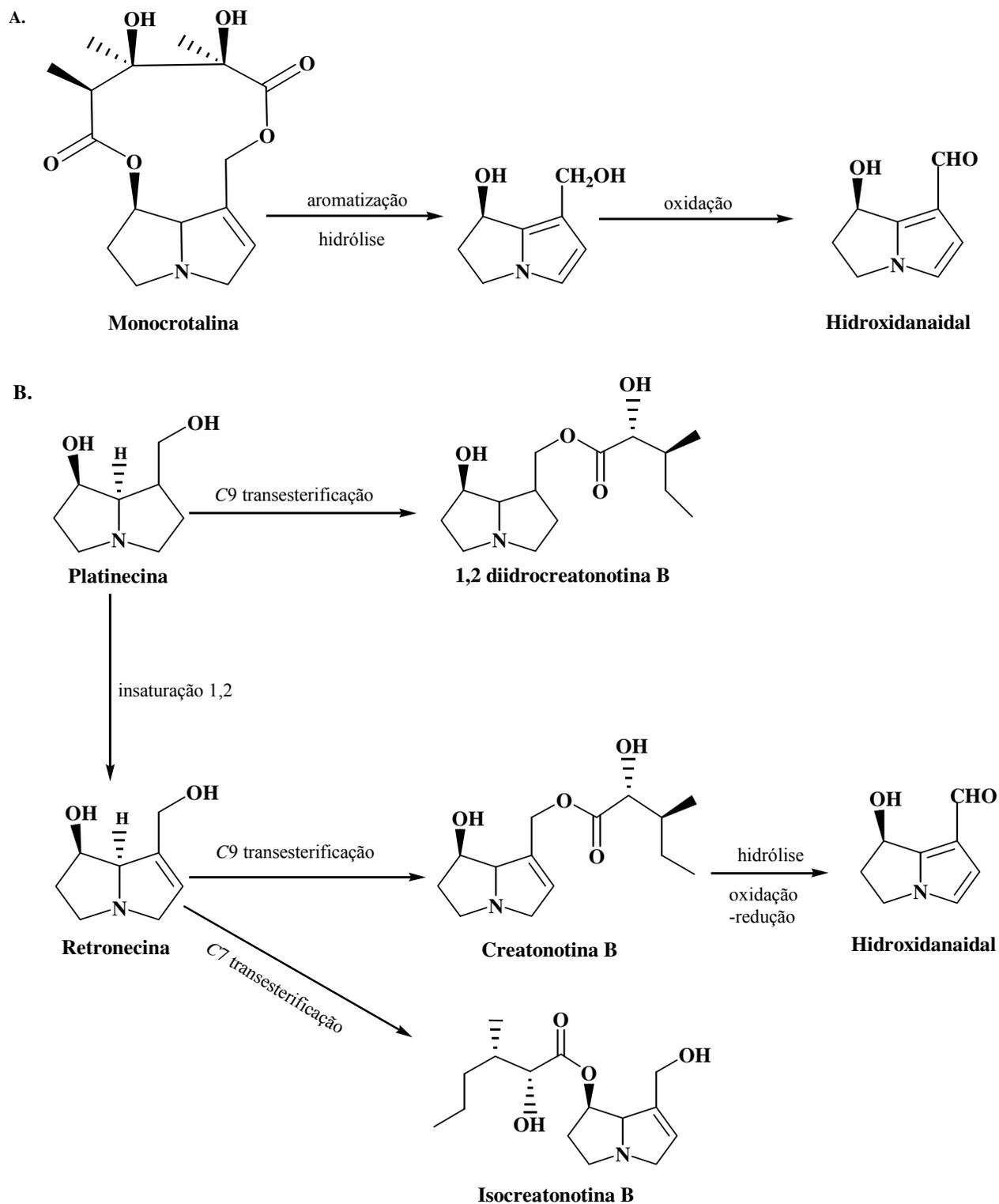


Figura 4. Metabolismo e transformações bioquímicas de diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos incorporados em dieta e sequestrados por *Utetehisa ornatix* em diferentes fases de desenvolvimento: A- Sequestro e biossíntese do hidroxidanaidal a partir da

monocrotalina. B- Sequestro, modificação bioquímica e transesterificação inseto-específica das bases necinas platinecina e retronecina em insect PAs e biossíntese do hidroxidanaidal.

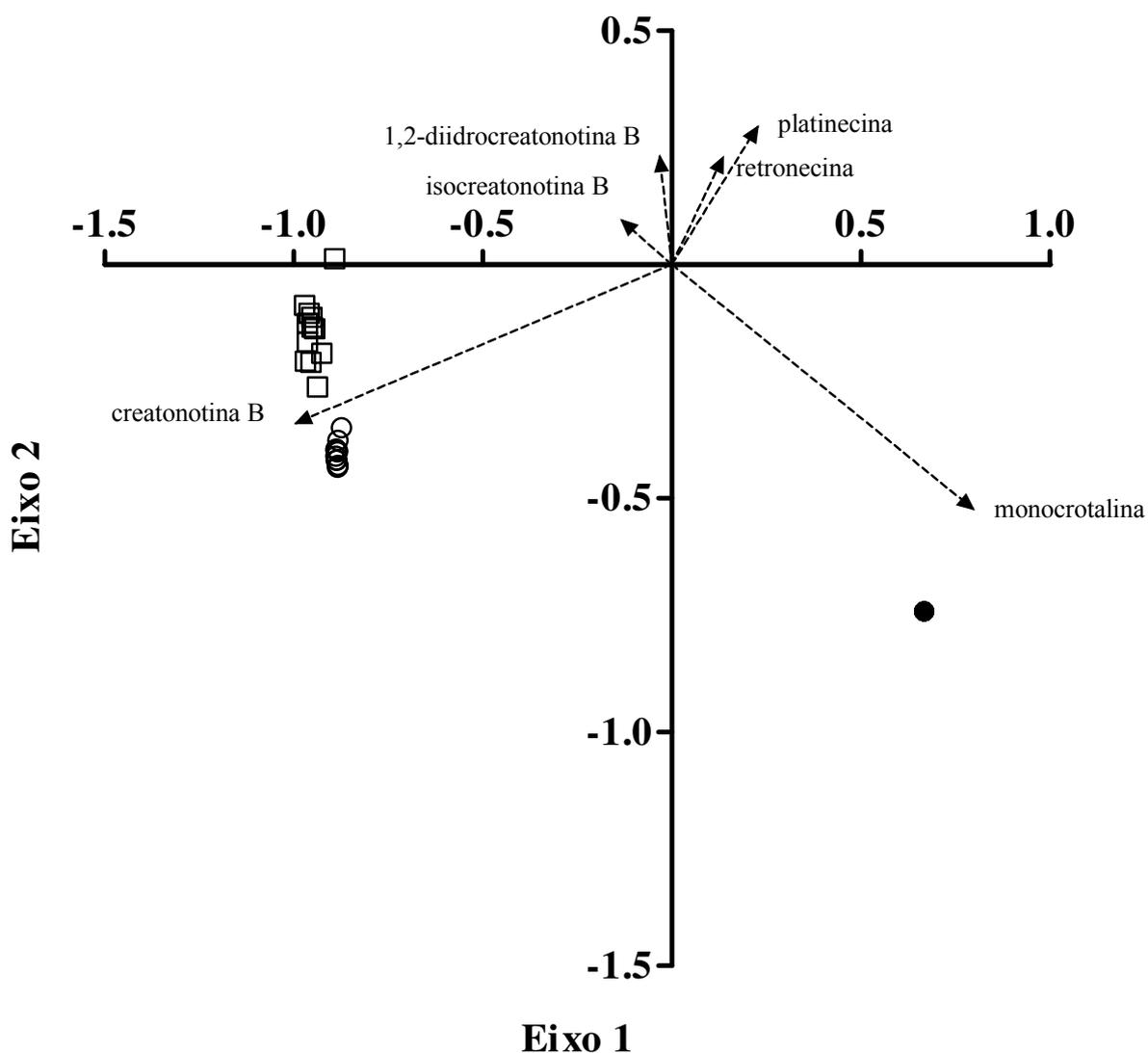


Figura 5. Análise dos componentes principais da abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos em diferentes estágios de desenvolvimento (larva, pupa, machos e fêmeas) de *Utetheisa ornatrix*, cujas larvas foram alimentadas em dietas com três alcaloides diferentes [monocrotalina (círculo preto), retronecina (círculo branco) e platinecina (quadrado branco)]. O eixo 1 explica 70,94% da variância total e o eixo 2 explica 24,67%. Os vetores originados no centro da figura representam os alcaloides fortemente relacionados com o padrão de componentes principais.

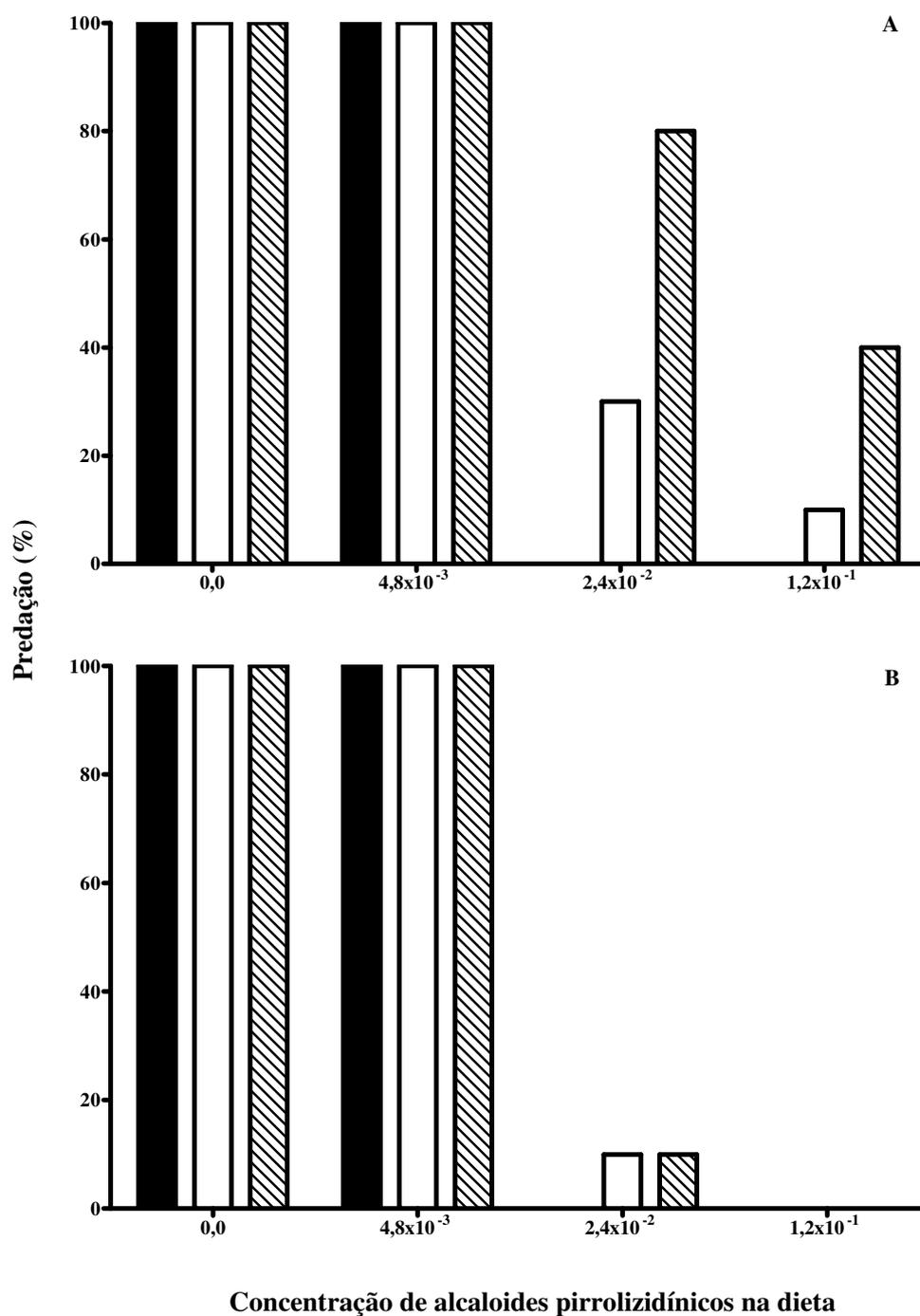


Figura 6. Percentagem de larvas de *Utetheisa ornatrix* predadas pela aranha *Lycosa erythrognatha* (A) e pintinhos *Gallus gallus* (B). As larvas se alimentaram em dieta artificial contendo diferentes classes estruturais de alcaloides pirrolizidínicos (APs) em diferentes concentrações [monocrotalina (preto), retronecina (branco), platinecina (listrado)].

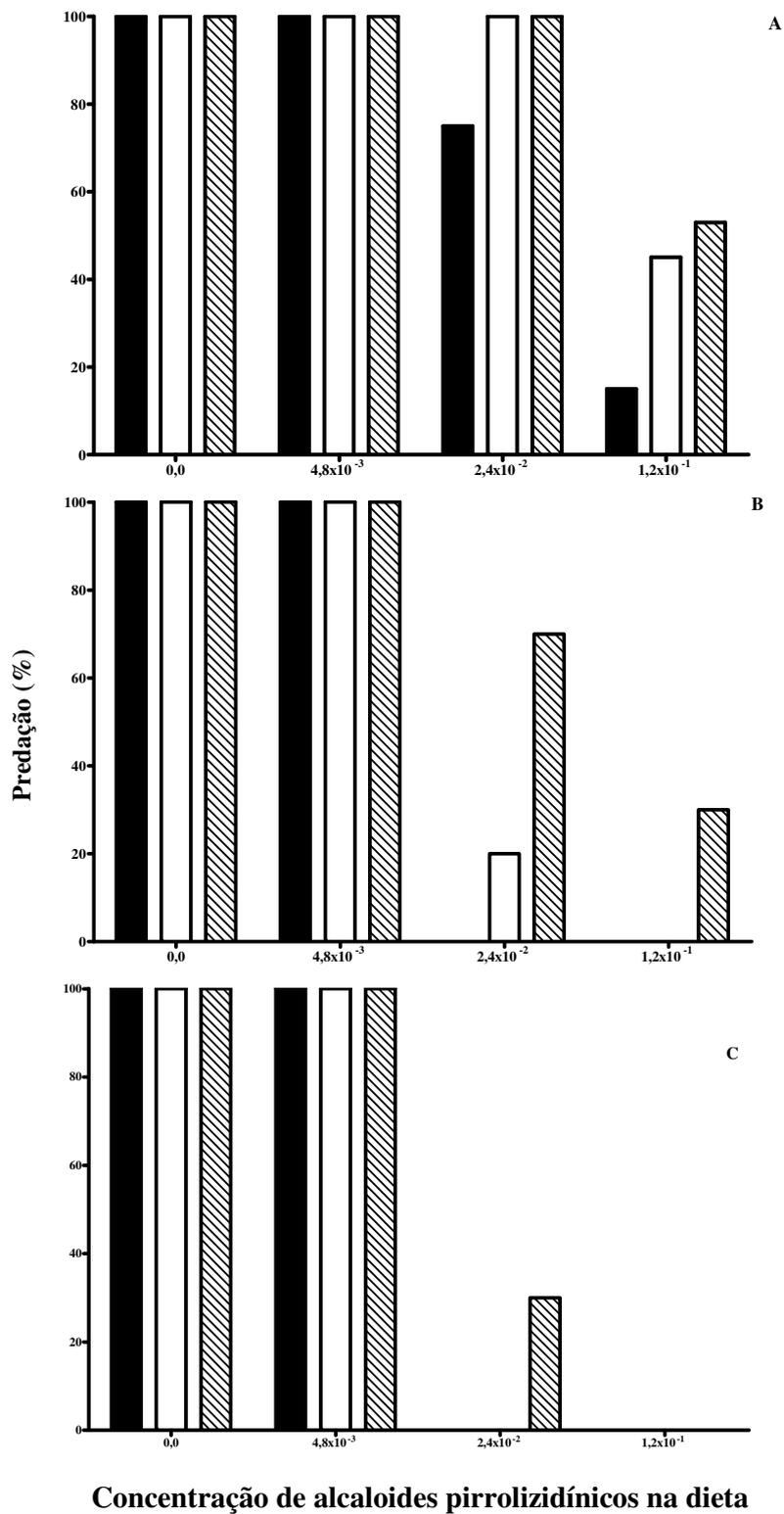


Figura 7. Percentagem de adultos de *Utetheisa ornatrix* predados pelas aranhas *Nephila clavipes* (A), *Lycosa erythrognatha* (B) e pintinhos *Gallus gallus* (C). Os adultos são originados de larvas que se alimentaram em dieta com diferentes concentrações de diferentes

alcaloides pirrolizidínicos [monocrotalina (preto), retronecina (branco), platinecina (listrado)].

Machos e fêmeas foram agrupados, desde que sexo não apresentou diferenças significativas nas análises estatísticas (veja Tabela 10).

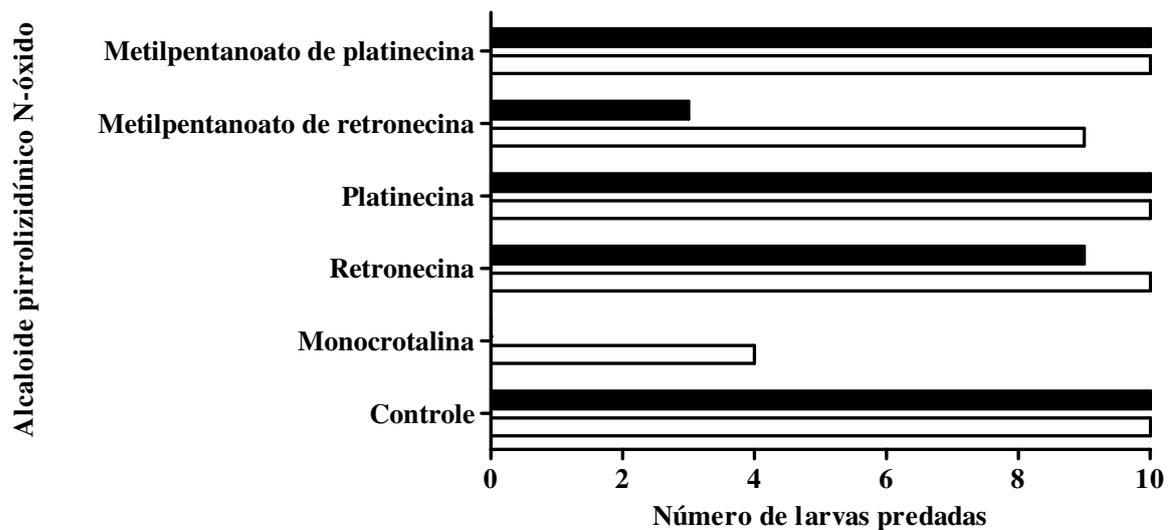


Figura 8. Número de larvas palatáveis de *Tenebrio molitor* (n=10) tratadas com 0,3 (branco) e 3,0 µg/mg (preto) de diferentes alcaloides pirrolizidínicos N-óxidos, que foram predadas pela aranha *Nephila clavipes*.



## CAPÍTULO 3

### **Alcaloides pirrolizidínicos na mariposa *Scearctia figulina* (Erebidae: Arctiinae: Pericopina): metabolismo e defesa química contra diferentes predadores**

#### **Resumo**

Alcaloides pirrolizidínicos (APs) desempenham um papel central em interações multitróficas entre plantas, herbívoros e seus inimigos naturais. Este sistema químico de defesa de plantas é bem caracterizado pelo efeito tóxico e deterrente contra herbívoros vertebrados e invertebrados. No entanto, vários insetos herbívoros desenvolveram adaptações evolutivas para sobrepujar essa barreira química da planta, permitindo o sequestro desses compostos e sua utilização na proteção química contra predação e comunicação sexual. Neste trabalho, nós investigamos o sequestro e transformações bioquímicas de APs pela mariposa Neotropical especialista *Scearctia figulina* (Arctiinae), que enquanto larva se alimenta de folhas de *Heliotropium transalpinum* (Boraginaceae), bem como o papel destes compostos na defesa contra diferentes predadores. Nós combinamos uma detalhada análise química da concentração e do perfil qualitativo de APs presentes na planta hospedeira e nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* com bioensaios de predação em campo e laboratório com predadores vertebrados e invertebrados. Nossos resultados mostram que *S. figulina* possui uma elevada plasticidade metabólica e bioquímica em sequestrar e processar os APs em *H. transalpinum*. Nós detectamos os APs em todo ciclo de vida da mariposa e o perfil qualitativo dos APs presentes em diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* mostrou-se completamente distinto do padrão da planta hospedeira. Os APs são sequestrados

pela larva, e são metabolizados especificamente por dois mecanismos principais: (1): inversão estereoquímica de ésteres de heliotridina com configuração (7*S*) e/ou (3'*R*) para uma configuração (7*R*) e/ou (3'*S*), o que indica uma eficiente epimerização inseto-específica e (2): hidrólise da ligação éster e formação de alcaloides característicos de insetos (“insect PAs”) a partir da re-esterificação da base necina da planta com um ácido nécico do próprio inseto. Podemos observar que larvas e adultos de *S. figulina* são protegidos contra predadores invertebrados: - as aranhas neotropicais *Nephila clavipes* (Nephilidae) e *Lycosa erythrognatha* (Lycosidae), e predadores vertebrados visualmente orientados: - aves *Gallus gallus* (Phasianidae). Esta proteção química pode estar fortemente associada aos APs sequestrados da planta hospedeira *H. transalpinum*. Nós discutimos esses resultados em termos da capacidade bioquímica e metabólica de *S. figulina* em processar diferentes APs e a importância funcional destes mecanismos frente a pressões seletivas de diferentes predadores.

**Palavras-chave** – defesa química, Arctiinae, insect PAs, *Heliotropium transalpinum*, Licopsamina, *Nephila clavipes*, *Lycosa erythrognatha*, *Gallus gallus*

## Introdução

Alcaloides pirrolizidínicos (APs, Figura 1) representam um modelo de estudo interdisciplinar para se investigar interações tritróficas mediadas por compostos secundários de plantas (Hartmann 2004a). Estes alcaloides compreendem um sistema químico de defesa de plantas expressos constitutivamente por diversos grupos taxonômicos de plantas das famílias Asteraceae (tribos Senecioneae e Eupatorieae), Boraginaceae, Fabaceae (tribo Crotalarieae), Orchidaceae e Apocynaceae (tribo Echiteae), além de poucas espécies de Convolvulaceae, Ranunculaceae, Celastraceae, Santalaceae e Rhizophoraceae (Hartmann & Ober 2008; Hartmann 2009). Do ponto de vista estrutural, APs são ésteres de uma base necina (anel pirrolizidínico) com diferentes ácidos nécicos totalizando cerca de 360 estruturas e podem ocorrer na forma de base livre e *N*-óxido (Hartmann 1999). Os APs com a dupla ligação na posição 1,2 (alcaloides 1,2-desidropirrolizidínicos) apresentam atividade hepatotóxica, pneumotóxica e carcinogênica em vertebrados (Mattocks 1986, Stegelmeier et al. 1999), genotóxica em insetos (Frei et al. 1992) e deterrente contra herbívoros vertebrados e invertebrados (Macel 2011).

No entanto, grupos filogeneticamente distintos de insetos herbívoros se especializaram em usar plantas com APs como alimento e evoluíram uma série de mecanismos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos para sobrepujarem essa barreira química defensiva da planta, incorporando e armazenando os APs em seus tecidos (Nishida 2002). O sequestro de APs confere vantagens em termos de proteção química contra predação por inimigos naturais e na comunicação sexual entre adultos (Optiz & Müller 2009, Macel 2011, Trigo 2011). Em Lepidópteros, este fenômeno está associado a clados distintos como as borboletas Danaini e Ithomiini (Nymphalidae: Danainae) e mariposas Erebidae (Arctiinae) (Trigo et al. 1996, Weller et al. 1999, Conner & Weller 2004, Trigo 2008, 2011).

Outros exemplos ocorrem em algumas espécies de besouros da família Crysomelidae (Pasteels & Hartmann 2004), o gafanhoto *Zonocerus variegatus* (Biller et al. 1994), o pulgão *Aphis jacobaeae* (Witte et al. 1990) e o hemíptero *Largus rufipennis* (Klitzke & Trigo 2000). A maioria dos insetos que sequestram APs de suas plantas hospedeiras, tornando-se impalatáveis, são aposemáticos, apresentando uma coloração conspícua que alerta ao predador o seu sabor desagradável (Ruxton et al. 2004). Os APs são obtidos durante a alimentação na planta enquanto larva ou por farmacofagia durante o estágio adulto (Boppré 1986).

A integração de APs na biologia destes insetos especialistas é altamente sofisticada, e apesar de possuírem diferentes histórias de vida, borboletas Ithomiini e Danaini e mariposas Arctiinae compartilham alguns mecanismos adaptativos determinantes que regem o recrutamento e utilização destes compostos (Nishida 2002), a saber:

(1) Armazenamento dos APs sequestrados preferencialmente em tecidos estratégicos (cutícula e escamas de asas) (Brown 1984, Egelhaaf et al. 1990, Rossini et al. 2003), na forma metabolicamente estável de *N*-óxido (Lindigkeit et al. 1997, Brückmann et al. 2000);

(2) Transformações bioquímicas de APs envolvendo uma eficiente epimerização inseto-específica (inversão estereoquímica) dos centros assimétricos C7 e C3' (Schulz et al. 1993; Trigo et al. 1994) e biossíntese de alcaloides específicos de insetos (“insect PAs”) por meio da esterificação da base necina da planta com um ácido nécico do próprio inseto. Esses processos estão relacionados a uma transmissão eficiente de diferentes estruturas de APs do estágio larval até adultos e a produção de feromônios sexuais em machos (revisão em Hartmann 2009);

(3) Seleção sexual por meio de feromônios derivados de APs da planta. Machos produzem diidropirrolizinas, que são disseminadas por órgãos androconiais eversíveis, atraindo fêmeas (Eisner & Meinwald 2003). A fêmea seleciona machos com maior

quantidade de feromônios, já que essa quantidade é diretamente ligada à quantidade de APs que o macho possui e irá transferir para a fêmea (Eisner & Meinwald 1995);

(4) Transferência biparental de APs para os ovos (Boppré 1990; Dussourd et al. 1988; González et al. 1999; Conner et al. 2000).

Este cenário representa os aspectos fisiológicos, bioquímicos e ecológicos que permeiam a evolução da impalatabilidade relacionado ao sequestro de APs por Lepidópteros. Esses mecanismos podem ter sido desenvolvidos em virtude de requerimentos físico-químicos ou fisiológicos e em termos de melhor desempenho ecológico para o inseto (Brower 1984; Bowers 1992), provavelmente dirigidos por forças seletivas de predação e/ou da seleção sexual mediada por feromônios derivados de APs (Eisner & Meinwald 1995). Evidências da proteção química de insetos conferida por APs foram demonstradas experimentalmente por bioensaios de predação com a aranha *Nephila clavipes* (Nephilidae), que libera de sua teia sem sinais de injúrias borboletas e mariposas que possuem APs e/ou presas palatáveis impregnadas com estes alcaloides (Vasconcellos Neto & Lewinsohn 1984; Brown 1984; Trigo et al. 1993, 1996, 2011). Adicionalmente, verificou-se que APs apresentam atividade contra diferentes predadores, desde invertebrados como formigas e outras aranhas, e vertebrados como répteis, aves e mamíferos (Trigo 2011, Nishida 2002).

Neste trabalho nós utilizamos um modelo biológico representado pela mariposa *Scearctia figulina* (Erebidae: Arctiinae) (Figura 2), que se alimenta de folhas de plantas do gênero *Heliotropium*, os quais que contém APs (Trigo et al. 1993) (Figura 2). Nós investigamos o sequestro de diferentes APs presentes em *Heliotropium transalpinum* (Figura 2) por larvas da mariposa, destacando o metabolismo e transformações bioquímicas que ocorrem ao longo da metamorfose do inseto e o papel destes compostos e seus metabólitos na proteção química contra diferentes predadores vertebrados e invertebrados. Nós combinamos uma detalhada análise química da concentração e do perfil qualitativo de APs presentes na

planta hospedeira e nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* com bioensaios de predação em campo e laboratório com as aranhas *N. clavipes* (Nephilidae), *Lycosa erythrognatha* (Lycosidae) e o predador visualmente orientado a ave *Gallus gallus* (Phasianidae) para explicarmos como APs estão mediando estas interações tritróficas.

## Material e Métodos

*Organismos estudados.* O gênero *Heliotropium* (Boraginaceae) possui cerca de 200 espécies com distribuição Pantropical desde a região Turco-iraniana até a América do Sul (Diane et al. 2004), concentradas principalmente em zonas tropicais secas (Miller 2003). No Brasil, representantes deste gênero ocorrem principalmente na caatinga e campos sulinos, com menor representatividade em ambientes litorâneos, cerrado e campos rupestres (Melo & Semir 2008). *Heliotropium transalpinum* Vell. (Figura 2) é a espécie que possui a distribuição mais ampla, ocorrendo desde o México, Antilhas, alcançando Argentina e Brasil (Melo & Sales 2004). Essa espécie ocupa ambientes de cerrado, matas mesófilas e ciliares, campos sulinos e, menos frequentemente, áreas pantanosas do nordeste (BA) e Brasil Central (MS), e em caatinga (BA, MG). Habita clareiras ou ambientes abertos sobre solos argilosos ou argiloso-pedregosos (Melo & Semir 2008). Do ponto de vista químico, este gênero caracteriza-se principalmente pela presença de APs do tipo licopsamina (Trigo et al. 1993).

A mariposa *Scearctia figulina* (Butler) (Erebidae: Arctiinae: Pericopina) (Figura 2) é uma espécie Neotropical, cujas larvas foram encontradas se alimentando em folhas e inflorescências de *Heliotropium transalpinum* e aceitam também folhas de *Heliotropium indicum* (JR Trigo, observação pessoal). Os adultos são geralmente encontrados voando ao redor das plantas hospedeiras (CHZ Martins, observação pessoal).

*Criação dos lepidópteros.* Mantivemos uma criação massiva no Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Unicamp, em uma câmara climatizada a 27 °C, com luminosidade controlada (12h luz: 12h escuro), sem controle de UR. Nós obtivemos os ovos por meio da inspeção visual em indivíduos de *H. transalpinum* (postura contendo em média  $87,3 \pm 11,18$  ovos,  $n = 10$ ) plantados em uma área

de mata preservada próxima ao Departamento de Biologia Animal (22°49'15,70"S, 47°04'10,50"O). Os ovos foram acondicionados em recipientes plásticos (5 cm de diâmetro × 6 cm de altura) até o momento da eclosão. Essa espécie apresenta as larvas gregárias, sendo assim criamos as larvas agrupadas (15 – 10 larvas por recipiente) em recipientes de plástico maiores (11 cm de diâmetro x 18 cm de altura). Nós oferecemos diariamente folhas de *H. transalpinum ad libitum* até o momento da pupação. As fezes produzidas foram coletadas diariamente e armazenadas a -20°C. Nós individualizamos as pupas em recipientes de plástico (5 cm de diâmetro × 6 cm de altura) até a emergência para a obtenção dos adultos.

*Alcaloides pirrolizidínicos.* Para analisarmos quantitativamente os APs sequestrados durante os diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* e nas folhas de *H. transalpinum*, nós liofilizamos 10 amostras de cada estágio de desenvolvimento, e 5 amostras da planta hospedeira durante 48 horas em um liofilizador (Labconco Freezone 6 Liter Freeze Dry System, Models 77530). Homogeneizamos as amostras individualmente com EtOH (5x volume em relação ao peso seco da amostra) em tubos de vidro com areia do mar extra pura (J.T. Baker) com auxílio de um bastão de vidro. Esse processo foi repetido três vezes. Os extratos etanólicos foram centrifugados durante 10 minutos a 2318 fcr x g, os sobrenadantes agrupados e secos em rotaevaporador à baixa pressão, à temperatura de 40°C. O extrato seco foi ressuscitado em 10 mL de EtOH. Os alcaloides totais (bases livres + N-óxidos) foram quantificados colorimetricamente a partir de uma alíquota (1/10) da fração etanólica de acordo com Trigo et al. (1993, 1996a). Para cada indivíduo, nós realizamos a leitura em triplicata, utilizando a média de absorvância para o cálculo da quantidade de APs. Como padrão para a construção da curva de calibração usamos monocrotalina, obtida de sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae) (absorvância =  $0,393 \cdot x$  µg de monocrotalina,  $r^2 = 0,987$ ). Para a leitura da absorvância usamos um espectrofotômetro digital, modelo SP-22, marca

Biospectro (faixa de leitura 325-1000nm) com resolução de  $\pm 0,078$  Å. Nós expressamos a concentração de AP em  $\mu\text{g}$  de APs/mg de massa seca de *S. figulina* ou *H. transalpinum*.

Para caracterização dos APs, nós extraímos 5 amostras de folhas da planta hospedeira, 3 amostras de ovos, 3 de larvas, 3 de pupas e 3 de cada um dos sexos de adultos recém-emergidos da pupa, usando o procedimento ácido-básico descrito em Trigo et al. (1996a,b). Os extratos alcaloídicos foram analisados por cromatografia gasosa (CG-EM) de acordo com Trigo et al. (1996a,b) em um cromatógrafo gasoso Hewlett Packard Série 6890 acoplado a um detector de massas Hewlett Packard Série 5973 (Agilent), equipado com uma coluna de sílica fundida capilar (HP-5, 5% fenil- 95% dimetilsiloxano, 30 m x 320  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Nós utilizamos as seguintes condições no CG-EM: temperatura de injeção: 250°C; programas de temperatura: 70-300°C ou 150-300°C, 4°C/min; temperatura da linha de transferência: 280°C; fluxo do gás de arraste (He): 1ml/min e o modo de injeção com razão de divisão, usando a razão 20:1. A concentração da amostra a ser injetada foi 10 mg/ml. Utilizamos majoritariamente o modo impacto de elétrons, e quando necessário ionização química positiva. O volume injetado foi sempre 1  $\mu\text{l}$ .

Os APs foram caracterizados por meio do padrão de fragmentação de massas e do índice de retenção (IR) de cada composto. O IR foi calculado coinjetando-se *n*-alcanos (de C<sub>12</sub> até C<sub>40</sub>) com as amostras, segundo van den Dool & Kratz (1963). Os padrões de fragmentação foram obtidos em Trigo et al. (1993, 1996a,b, 2003); Hartmann et al. (2004b, 2005a), Flores et al. (2009) e El-Shazly & Wink (2014).

*Defesa química de Scearctia figulina contra diferentes predadores.* Para investigarmos como o papel dos APs sequestrados e processados bioquimicamente influencia a defesa química de larvas e adultos de *S. figulina* realizamos bioensaios anti-predação com três espécies de predadores em potencial: as aranhas *Nephila clavipes* (Nephilidae) e *Lycosa erythrognatha* (Lycosidae), e pintinhos *Gallus gallus* (Phasianidae). A permissão para a pesquisa com esses animais foi fornecida pelo IBAMA-ICMBio (Ministério do Meio Ambiente, Brasil).

A aranha *Nephila clavipes* é uma espécie de distribuição neotropical, encontrada frequentemente em bordas de clareiras em florestas, ao longo de trilhas na mata, nas bordas de mananciais e riachos (Robinson & Mirick, 1971), locais onde geralmente insetos são observados voando. Predador e presa podem ocorrer simpatricamente e adultos de *S. figulina* podem cair na teia de *N. clavipes* durante o forrageamento, acasalamento e na busca de plantas hospedeiras para oviposição (Martins & Trigo, observação pessoal). *N. clavipes* preda abelhas, vespas, borboletas e mariposas, mas liberam ilesos insetos que apresentam APs (ver revisão em Trigo 2011). Nós dividimos as respostas de *N. clavipes* às presas oferecidas nos ensaios em predação e liberação [segundo Robinson & Mirick (1971) e Vasconcellos-Neto & Lewinsohn (1984)]. Também consideramos como predação o comportamento da aranha de injetar veneno na presa, mesmo se após este primeiro contato, a aranha liberasse a presa morta, uma resposta definida como “rejeição” por Vasconcellos-Neto & Lewinsohn (1984). Nós realizamos os bioensaios de predação com *N. clavipes* em dois fragmentos de floresta na região de Campinas (São Paulo, Brasil): Mata Santa Genebra (22°49'39.06"S, 47° 6'18.27"W) e o Parque Ecológico Hermógenes de Freitas Leitão Filho (22°48'36.96"S, 47° 4'31.02"W). Nós realizamos os bioensaios entre fevereiro e maio, época em que as aranhas ocorrem em abundância, no período diurno (das 9:00 às 16:00 h). Nós utilizamos somente aranhas fêmeas adultas e saudáveis, que respondiam imediatamente quando uma presa era jogada na sua teia,

e cada aranha foi testada uma única vez. Nós realizamos os bioensaios com adultos de *S. figulina* obtidos a partir de uma criação em laboratório e indivíduos coletados no campo (10 indivíduos por sexo, totalizando 40 adultos). Um dia após emergirem da pupa, nós congelamos os adultos de laboratório à -20°C, e os armazenamos durante um período máximo de uma semana, até a realização bioensaio. Nós fizemos o mesmo procedimento com indivíduos coletados no campo. Transportamos os adultos em uma caixa de isopor com gelo picado e sal (-5°C) até o local do bioensaio. Com o auxílio de uma pinça de colecionador de selos, lançamos os adultos individualmente na metade inferior da teia de *N. clavipes*, e observamos o comportamento da aranha, conforme descrito acima. Quando a aranha matava e levava o indivíduo para o centro da teia, o experimento estava validado e terminado. Se a aranha liberava o indivíduo ou “rejeitava” o mesmo, oferecíamos um adulto palatável de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) para controle da saciedade. Se a aranha aceitasse a presa palatável, validava o resultado do bioensaio. Caso a aranha liberasse a presa palatável, o resultado do bioensaio era descartado. Os adultos de *D. saccharalis* foram congelados pelo mesmo período que *S. figulina*. As mariposas palatáveis foram obtidas comercialmente na empresa BUG – Agentes Biológicos.

A aranha *Lycosa erythrognatha* (Lycosidae), conhecida popularmente como aranhas-lobo, é uma predadora de solo e geralmente emboscam suas presas (Foelix, 2011). Esse predador reage principalmente às vibrações causadas pelo bater de asas ou o caminhar de suas presas; pistas visuais também tem um papel na detecção de presas, mas os olhos das aranhas-lobo visualizam somente uma imagem grosseira, então somente presas que estejam muito perto são percebidas (Foelix, 2011). Larvas de *S. figulina* podem ser potencialmente vulneráveis à predação por *L. erythrognatha* quando essas se locomovem para longe de sua planta hospedeira em busca de um local de pupação, ou quando caem de sua planta hospedeira, devido a eventos estocásticos (como o vento, ataque de formigas, Martins &

Trigo, observação pessoal). Da mesma forma, adultos são vulneráveis à predação quando estão em repouso geralmente próximo a manchas de sua planta hospedeira. Nós conduzimos os bioensaios de predação com *L. erythrognatha* utilizando o mesmo delineamento descrito por González et al. (1999) e Massuda & Trigo (2009). Coletamos as aranhas em uma área de gramado no Campus da Universidade Estadual de Campinas (22°49'14,76"S, 47°4'12,38"W). Mantivemos as aranhas isoladamente em recipientes de vidro transparentes (14,5 cm de diâmetro x 18 cm altura) contendo uma pequena camada de areia fina no seu interior. Nós alimentamos as aranhas semanalmente com larvas palatáveis do besouro *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) e fornecíamos água em um algodão umedecido, o qual era trocado diariamente. Utilizamos somente fêmeas saudáveis e ativas, uma semana depois se predaram uma larva de *T. molitor*. Cada aranha foi usada uma única vez. Para testarmos a impalatibilidade da presa, usamos larvas de último instar de *S. figulina* criadas em laboratório (n=13) e adultos obtidos em laboratório e no campo (10 indivíduos por sexo, totalizando 40 adultos). Com o auxílio de uma pinça de 30 cm de comprimento, larvas e adultos foram oferecidos à aranha bem próximos as quelíceras da mesma. Nós consideramos a resposta da aranha como predação se as larvas ou adultos de *S. figulina* fossem capturados, mortos e/ou consumidos; nesse caso o bioensaio era validado sem experimentos adicionais. Consideramos como liberação quando a aranha, após tocar o indivíduo com suas quelíceras, liberasse o mesmo ileso e esse sobrevivesse após 24 horas. Essa resposta só era validada se após a liberação da presa a aranha predava os indivíduos palatáveis, como descrito acima. No caso de larvas, usamos como controle larvas palatáveis de *T. molitor*.

Escolhemos indivíduos jovens da ave *Gallus gallus* (Galliformes:Phasianidae) como um modelo de predador vertebrado, visualmente orientado, porque os mesmos são sensíveis à presas impalatáveis (Massuda e Trigo, 2009 e referências que ali constam). Nós realizamos o bioensaio de acordo com Nogueira-de-Sá & Trigo (2005) e Massuda & Trigo (2009).

Adquirimos os indivíduos comercialmente em lojas de animais com um dia de vida e nós os mantivemos em grupo no interior de uma gaiola durante uma semana. Alimentamos as aves duas vezes ao dia a base de ração para aves e água, ambos *ad libitum*, em temperatura e fotoperíodo ambientes. Após esse período, nós individualizamos cada um e numeramos os seus pés para posterior identificação. Nós os treinamos por três dias, duas vezes por dia, para aceitarem larvas palatáveis do besouro *T. molitor*. Antes do oferecimento destes, nós deixamos as aves 2 horas sem alimentação individualmente em uma gaiola (30×30×40 cm) e oferecemos os organismos testados para as aves durante 2 min, em uma placa de petri (6 cm de diâmetro). Nós descartamos indivíduos que não respondiam às presas controle. Após o terceiro dia de treinamento realizamos os bioensaios com larvas de último instar e adultos de *S. figulina*. Nós utilizamos como grupo controle larvas de *T. molitor*. Após 2 horas de jejum, acondicionamos cada indivíduo de *G. gallus* como descrito acima e oferecemos inicialmente o primeiro controle (uma larva de *T. molitor*). Se a ave consumia o primeiro controle, nós oferecíamos uma larva ou adulto de *S. figulina* e observávamos a resposta da ave: (1) bica e consome, (2) bica, mata e descarta, (3) bica e libera a larva ou adulto vivo, e (4) não bica. As respostas (1) e (2) foram consideradas predação e a resposta (4) liberação; na resposta (3), caso o indivíduo testado sobrevivesse ao ataque depois de 24 horas, consideramos liberação, caso contrário, predação. Utilizamos cada pintinho uma única vez. Se o indivíduo testado fosse liberado, nós validávamos o bioensaio somente se a ave predasse o segundo controle oferecido. Testamos 18 larvas de último instar de *S. figulina* e 10 indivíduos adultos por sexo, criados em laboratório e coletados no campo, totalizando 40 adultos.

*Análises estatísticas.* Nós verificamos se a concentração de APs difere significativamente entre os diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* usando uma ANOVA de um fator (Zar 2010). Além disso, efetuamos uma análise de componentes

principais (Legendre & Legendre 1998) para verificar se larvas de *Scearctia figulina* alimentadas em folhas de *Heliotropium transalpinum* eram agrupadas com sua planta hospedeira em função dos APs.

Comparamos a frequência das larvas predadas (1) e não predadas (0) usando duas abordagens, pois não fizemos bioensaios com larvas no predador *N. clavipes*. Na primeira comparamos a resposta dos três predadores ao controle e machos e fêmeas recém-emergidas. Na segunda comparamos a resposta de *L. erythrognatha* e *G. gallus* ao controle, larvas e machos e fêmeas recém-emergidas. Usamos um modelo generalizado linear (GLM), com o teste de log-verossimilhança do tipo 1, usando distribuição binomial, função de ligação logit e correção de desvio para corrigir a superdispersão (McCullagh & Nelder 1989, p. 98; Statistic 7.0, StatSoft, Inc. 2004). Posteriormente, comparamos a frequência dos indivíduos predados e não predados par a par entre si, usando a correção de Bonferroni, onde o nível de significância é dado por  $\alpha/\text{número de comparações}$  ( $0,05/3 = 0,017$  no primeiro caso e  $0,05/6 = 0,008$  no segundo caso) (Zar 1999).

## Resultados

*Alcaloides pirrolizidínicos.* Não verificamos diferença significativa entre a concentração de APs nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* analisados (Anova de um fator,  $F_{3, 56} = 2,337$ ,  $P = 0,083$ , Figura 3). As folhas de *H. transalpinum* possuem  $0,749 \pm 0,053$   $\mu\text{g}$  de AP por mg de peso seco e caracterizaram-se predominantemente pela presença de rinderina (7S, 3'R, IR 2185) e 3'-acetilrinderina (IR 2245), que juntos correspondem a 90% do total dos APs. A supinina (3'R, IR 2020) e 3'-acetil-supinina (IR 2095) ocorrem em menor abundância, com aproximadamente 8% do total de APs da planta. A 3'-acetilintermidina (7R, 3'R, IR 2220) ocorre em baixa abundância, com 1,29% do total de APs (Figura 3, Tabela 1). Tanto os dados de concentração relativa (Tabela 1), quanto à análise de componentes principais (Figura 4) mostram que os APs em *S. figulina* não são agrupados com os alcaloides presentes na planta hospedeira. Nós verificamos que o perfil dos APs presentes em diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* é completamente distinto do padrão encontrado em *H. transalpinum* (Tabela 1 e Figura 5). Somente a supinina é sequestrada pela larva e mantida durante toda a metamorfose da mariposa. A 3'-acetilintermedina (IR 2220), presente na planta foi encontrada somente em traços nas larvas. Os demais APs presentes em *H. transalpinum* não estão presentes nas larvas e nos outros estágios de desenvolvimento. Nós observamos a predominância de intermidina (7R, 3'R, IR 2167) e licopsamina (7R, 3'S, IR 2175), que podem chegar a 70% do total de APs presentes nas diferentes fases do ciclo de vida da mariposa. A amabilina (3'S) foi encontrada em baixa quantidade (Tabela 1).

Além disso, encontramos alcaloides específicos biossintetizados pelas mariposas (“insect PAs”) com a base necina supinidina, retronecina e tipo-traquelantamidina. Estes alcaloides são formados pela larva de *S. figulina* a partir da esterificação da base necina

presente na planta com um ácido nécico derivado de aminoácidos originário do próprio inseto (Hartmann et al. 2009); esses APs estão presentes também nas pupas, adultos e ovos. Nós verificamos a predominância da calimorfina (IR 2024), resultante da esterificação da retronecina da planta com o ácido 2-hidróxi-3-metilbutírico (Edgar et al. 1980). Outros insect PAs também foram encontrados. A isocreatonotina A (IR 1877) e a creatonotina A (IR 1938), formados pela esterificação da retronecina derivada da planta com o ácido 2-hidróxi-3-metilbutanoato originado do inseto, respectivamente nos C7 e C9. A desoxicalimorfina (IR 1890) e a 7-desoxi-1,2-diidrocalimorfina IR (1883), o primeiro resultante da esterificação da base necina supinidina com o ácido 2-hidróxi-2-metilbutírico acetilado (Edgar et al. 2007), e o último formado pela esterificação da traquelantamidina ou seus isômeros com o mesmo ácido (Hartmann et. al. 2004b). Estes alcaloides característicos de insetos podem chegar a aproximadamente 20% do total dos APs sequestrados por *S. figulina* (Tabela 1). Nós também observamos a presença de traços da retronecina (IR 1484) em todos os estágios analisados, exceto nos ovos, e a presença de traços de APs do tipo 7-senecionil-retronecina (IR 1864) e 9-senecionil-retronecina (IR 1895). Adicionalmente, observamos a presença de APs não identificados com a base necina retronecina ou seu isômero (IR 2231, 2543 e 2581), que chegam a 8% do total dos alcaloides presentes nos insetos (Tabela 1).

*Defesa química de Scearctia figulina contra diferentes predadores.* Todos os estágios de desenvolvimento de *S. figulina* sofreram uma baixa percentagem de predação independente do predador utilizado, entretanto todas as larvas de *T. molitor* e adultos de *D. saccharalis*, utilizados como controle foram predados pelos três predadores (Figura 6). Verificamos que não há diferenças significativas na resposta dos três predadores (GLM, log-verossimilhança = -60,014, gl = 2,  $\chi^2 = 1.116$ , P = 0,573). Entretanto os organismos testados são predados diferencialmente (GLM, log-verossimilhança = -16.501, gl = 2,  $\chi^2 = 87,008$ , P < 0,001), isto

é, a predação sobre os controles é significativamente maior que a predação sobre machos e fêmeas recém-emergidos (comparações múltiplas de Bonferroni; controle x machos  $P < 0,001$ , controle x fêmeas  $P < 0,001$ , machos x fêmeas  $P = 0,999$ , Figura 6). Não há interação entre o tipo de predador e o restante dos organismos que foram liberados (GLM, log-verossimilhança = -16,510,  $gl = 4$ ,  $\chi^2 = 1$ ,  $P = 1,0$ ). Quando retiramos *N. clavipes* da análise e colocamos a larva entre os organismos testados, obtivemos um resultado similar. Não há diferenças significativas na resposta dos três predadores (GLM, log-verossimilhança = -75,003,  $gl = 1$ ,  $\chi^2 = 0,609$ ,  $P = 0,435$ ). Entretanto os organismos testados são predados diferencialmente (GLM, log-verossimilhança = -39,034,  $gl = 3$ ,  $\chi^2 = 71,937$ ,  $P < 0,001$ ), isto é, a predação sobre os controles é significativamente maior que a predação sobre larvas e machos e fêmeas recém-emergidos (comparações múltiplas de Bonferroni; controle x larvas  $P < 0,001$ , controle x machos  $P < 0,001$ , controle x fêmeas  $P < 0,001$ , larvas x machos  $P = 0,999$ , larvas x fêmeas  $P = 0,999$ , machos x fêmeas  $P = 0,999$ , Figura 6). Não há interação entre o tipo de predador e o restante dos organismos que foram liberados (GLM, log-verossimilhança = -39,0,  $gl = 3$ ,  $\chi^2 = 0,068$ ,  $P = 0,995$ ).

Observamos um comportamento de liberação da presa semelhante nos três predadores. Quando lançávamos os adultos de *S. figulina* na teia de *N. clavipes* a aranha inspecionava a presa com as pernas e palpos e rapidamente passava a cortar as teias que prendiam a mariposa e esta era liberada ileso, sem sinais de mordidas. Quando lançávamos as larvas e adultos próximos de *L. erythrognatha*, a aranha aprisionava a presa por meio das quelíceras e esse rápido contato era o suficiente para elicitar a resposta de rejeição do predador e os indivíduos testados eram liberados sem apresentarem sinais de mordidas, e logo após este processo a aranha utilizava as pernas e palpos para “limpar” as quelíceras. Podemos observar que tanto as larvas quanto os adultos de *S. figulina* geralmente foram bicadas uma única vez por *G. gallus* e imediatamente rejeitados após esse contato inicial, sem sinais aparentes de

perfurações ou extravasamento de fluido corporal. O predador posteriormente utilizava os pés para “limpar” o bico, ou até mesmo esfregava este no chão e paredes da gaiola onde estavam acondicionados.

## Discussão

*Sequestro, metabolismo e transformações bioquímicas de alcaloides pirrolizidínicos por Scearctia figulina: defesa química contra predadores.* Nós mostramos neste trabalho que os APs sequestrados da planta hospedeira por larvas de *S. figulina* são eficientemente transmitidos durante toda a metamorfose do inseto, visto que nós encontramos estes alcaloides em concentrações similares nos diferentes estágios de desenvolvimento da mariposa. Estes alcaloides são armazenados na forma de *N*-óxido, uma característica comum em arctíneos, que possuem na hemolinfa uma enzima monooxigenase flavina dependente (*pno*, do inglês, pyrrolizidine-alkaloid-*N*-oxygenase) altamente específica para APs (Lindgkeit et al. 1997; Naumann et al. 2002; Sehlmeier et al. 2010). Essa enzima chave *N*-oxida os APs na hemolinfa, que são absorvidos como base livre no intestino, permitindo que estes insetos se alimentem de plantas com APs e acumulem estes compostos em seus tecidos.

Nós observamos que larvas e adultos da mariposa são protegidos contra predadores invertebrados: - as aranhas *N. clavipes* e *L. erythrognatha*, e predadores vertebrados: - aves *Gallus gallus domesticus*. Esta proteção química pode estar fortemente associada aos APs sequestrados da planta hospedeira *H. transalpinum*. Nós detectamos a presença de APs nas diferentes fases de ontogenia da mariposa. Observamos que a resposta de liberação dos diferentes predadores frente a larvas, machos e adultos de *S. figulina*, foi similar, não ocorrendo diferenças significativas na percentagem de predação entre os diferentes estágios de desenvolvimento e sexo da mariposa. Isto pode ser explicado pela elevada concentração de APs nos tecidos de *S. figulina*, e pela variação que ocorre nesse valor entre indivíduos da mesma fase de desenvolvimento. Fêmeas por exemplo, possuem de 128-307 µg de AP, valores semelhantes dos observados em larvas (162-317 µg de AP) e machos (200-325 µg de AP).

Nós verificamos uma resposta comportamental de rejeição semelhante dos diferentes predadores em relação a larvas e adultos de *S. figulina*, caracterizada por uma breve inspeção inicial através de contato e rápida liberação da presa sem injúrias aparentes (mordidas ou bicadas) e extravasamento do fluido corporal. Este padrão comportamental pode ser explicado pela toxicidade de APs associada a um sabor amargo característico de compostos nocivos de insetos que possuem a capacidade de irritar, envenenar e/ou intoxicarem um predador. Provavelmente, além da capacidade de *S. figulina* sequestrar uma grande quantidade de APs da planta hospedeira, estes compostos podem estar armazenados preferencialmente em locais estratégicos, periféricamente, atuando como um revestimento químico que em larvas e adultos envia uma mensagem do sabor desagradável da presa a vários quimiorreceptores que o predador utiliza durante a inspeção inicial. Este processo é bem descrito no sistema de interação entre a mariposa especialista Arctiinae *Utetheisa ornatix* e plantas do gênero *Crotalaria* (Fabaceae), que contém APs em seus tecidos. Larvas de *U. ornatix* sequestram esses alcaloides de suas plantas hospedeiras e os retêm durante toda a metamorfose; machos transmitem esses APs para as fêmeas durante a cópula, e esta passa os alcaloides para os ovos (Eisner 2003; Hartmann, 2009; Trigo, 2011). Esses alcaloides defendem todos os estágios de desenvolvimento contra diferentes predadores vertebrados e invertebrados (revisão em Trigo 2011). Larvas e adultos de *U. ornatix* contendo APs são rejeitadas pelas aranhas *Nephila clavipes* (Nephilidae) e *Lycosa ceratiola* (Lycosidae) após um simples contato inicial com a presa, e liberadas sem injúria e sinais de perfuração (Eisner & Meinwald 1987; Eisner & Eisner, 1991). Em adultos de *U. ornatix*, os APs sequestrados da planta estão distribuídos por todo o corpo (cabeça, tórax, abdômen e asas) (Rossini et al. 2001), e estão incorporados em tecidos periféricos enquanto larva e até mesmo nas escamas de adultos, onde a concentração de AP pode chegar a 1-2% do total sequestrado pela mariposa nas asas (Rossini et al. 2003). O generalista adaptado a APs, *Cretonotos transiens*, transfere

os APs sequestrados e metabolizados para a cutícula, e todos os estágios de desenvolvimento da mariposa têm cerca de 60% do total de AP armazenado nos tecidos periféricos, otimizando a defesa contra predadores (Egelhaaf et al. 1990, Nickisch-Rosenegk et al. 1990).

O tipo de abordagem experimental utilizada neste trabalho é importante para entendermos melhor o fluxo de APs nos diferentes níveis tróficos: desde sua produção pela planta, o sequestro por insetos especialistas e o papel ecológico na defesa química contra predadores. Nós realizamos uma análise química detalhada da concentração e do perfil qualitativo dos compostos sequestrados e metabolizados nas diferentes fases da ontogenia de *S. figulina* associada a bioensaios de predação contra diferentes predadores. Desde modo, podemos observar como o processamento bioquímico de diferentes APs da planta hospedeira pela mariposa influencia a relação estrutura/atividade dos compostos metabolizados referente à proteção química contra predação.

Esse procedimento se faz necessário visto que várias forças ecológicas e evolutivas distintas podem atuar em diferentes estágios de vida de um inseto e a variação no espectro de predadores é fundamental, pois estes exercem pressões seletivas distintas no sistema estudado. Larvas geralmente são mais predadas por invertebrados e são mais vulneráveis ao ataque de parasitoides, adultos são presas em potencial para aves e morcegos, pupas que permanecem no solo são frequentemente predadas por roedores (revisão em Bowers 1992, 1993).

Nesse sentido, verificamos que o perfil dos APs sequestrados e metabolizados por *S. figulina* mostrou-se completamente diferente do padrão dos APs adquiridos da planta hospedeira, e que para o sequestro e transmissão nos diferentes estágios de desenvolvimento da mariposa, os APs da planta sofrem uma série de transformações bioquímicas. A predominância nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina* de APs com a configuração (7R) indica uma eficiente epimerização inseto-específica de ésteres da base necina heliotridina (rinderina e/ou 3'-acetilrinderina- 7S, 3'R) no seu éster (7R) retronecina

originado o AP intermidina. Adicionalmente, mostramos que ocorre a inversão estereoquímica no C3' dos APs adquiridos da planta, por meio da conversão em menores proporções da supinina (3'R) no seu isômero (3'S) amabilina. O mecanismo de conversão dos centros assimétricos deste APs indica que alcaloides com a configuração (7R) e em menores proporções (3'S) são preferencialmente transmitidos nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. figulina*.

As principais modificações bioquímicas de APs derivados de plantas em arctíneos envolvem um eficiente mecanismo inseto-específico de epimerização de alcaloides do tipo licopsamina com configuração (7S) e/ou (3'R). Em *C. transiens*, ésteres da base necina heliotridina como a heliotrina (7S-OH) são precursores do hidroxidanaidal (7R-OH), um feromônio produzido por machos, derivado do AP da planta (Schulz et al. 1993). O generalista *E. acrea* processa APs do tipo licopsamina presentes na dieta larval das seguintes formas: -epimerização 7(S) de ésteres da heliotridina gerando o éster de retronecina com configuração 7(R), - hidrólise do alcaloide gerando a retronecina livre, - formação das creatonotinas, -utilização das creatonotinas como intermediário comum na síntese do hidroxidanaidal (Hartmann et al. 2005a). Em *G. geneura*, que não sintetiza e emite o hidroxidanaidal, a rinderina com configuração (7S) (3'R), predominante no extrato de *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae), sofre um processo duplo de epimerização em ambos centros assimétricos gerando a licopsamina, com configuração (7R) (3'S) (Hartmann et al. 2005b).

Este mecanismo é bem representado em borboletas Ithomiine, que se alimentam por farmacofagia em plantas do gênero Boraginaceae (*Heliotropium*) e Asteraceae (*Eupatorieae*) contendo APs (revisão em Trigo 2008). Os adultos sequestram todos os estereoisômeros de APs do tipo licopsamina, mas grande parte é modificada bioquimicamente, e a licopsamina é mantida quase que exclusivamente (Trigo et al. 1994; Trigo et al. 1996a). Estes APs são

efetivos na proteção química de adultos contra predação por *N. clavipes* (Brown 1984, 1985). A mesma resposta de rejeição da aranha foi observada quando APs do tipo licopsamina sequestrados por estas borboletas (licopsamina e intermidina), foram aplicados topicamente em adultos palatáveis da borboleta *Biblis hyperia* (Nymphalidae) (Brown 1984, 1985; Trigo et al. 1996a). Os APs heliotrina e O<sup>9</sup>-senecionilretronecina quando aplicados topicamente em organismos palatáveis apresentaram atividade deterrente contra diferentes vertebrados insetívoros (Master 1992) e a aranha *N. clavipes* (Silva & Trigo 2002), respectivamente, de maneira dose-dependente.

Devemos destacar também a transformação bioquímica e a convergência dos diferentes APs sequestrados da planta hospedeira por *S. figulina* em “insect PAs”, alcaloides biossintetizados por vários arctíneos através da transesterificação inseto-específica da base necina da planta com um ácido néxico do próprio inseto (Edgar et al. 2007). Apesar da importância desse mecanismo estar bem descrita em termos da plasticidade no sequestro e metabolismo de diferentes alcaloides em arctíneos e na biossíntese de feromônio sexual hidroxidanaidal em machos (revisão em Hartmann 2009), pouca atenção está voltada para o papel destes metabólitos na defesa química contra predadores. Diferentes classes estruturais de insect PAs estão presentes em todas as fases de desenvolvimento de *S. figulina*, podendo alcançar 15% do total dos APs sequestrados. A presença da base necina retronecina livre indica a degradação parcial dos APs adquiridos da planta, através da hidrólise da ligação éster alílica fraca no C7 e/ou C9 destes compostos e subsequente transformação e algumas vezes modificação das bases necinas em alcaloides específicos de insetos. Este mecanismo explica a presença da creatonotina A, isocreatonotina A e calimorfina a partir da retronecina. A presença da 7-desoxicalimorfina indica a degradação parcial da supinina e/ou 3'-acetil-supinina e posterior reesterificação da base necina resultante, supinidina, com o ácido calimórfico. A presença da base necina tipo traquelantamidina 1,2 saturada (sem ocorrência

na planta) esterificada com o ácido calimórfico (7-desoxi-1,2-diidrocalimorfina), pode ser o resultado de um efeito derivado da degradação dos APs supinidina e 3'- acetil supinina, e posterior remoção da dupla ligação 1,2 do anel, o que necessita de mais esclarecimento.

Até o momento, apenas um trabalho mostra que a calimorfina aplicada topicamente em presas palatáveis apresenta atividade deterrente contra predação por *N. clavipes* de maneira dose-dependente (Silva & Trigo 2002). Martins et al. 2015 (submetido) mostraram que, adultos de *U. ornatrix* que enquanto larvas se alimentaram de folhas e sementes de *C. vitelina* possuem em seus tecidos exclusivamente uma mistura de “insect PAs”, são protegidos quimicamente contra predação por *N. clavipes*. Adicionalmente, estes autores demonstraram que a mistura de creatonotina B/isocreatonotina B *N*-óxido aplicadas topicamente em presas palatáveis foram 100% eficazes na proteção contra predação por *N. clavipes*, em concentrações similares as encontradas nos adultos. Martins & Trigo 2015 (em preparação) verificaram que larvas se alimentando em dieta contendo concentrações elevadas dos APs retronecina e platinecina possuem em seus tecidos quase que exclusivamente “insect PAs” e são mais protegidas enquanto larva e adultos contra diferentes predadores (as aranhas *N. clavipes* e *L. erythrogatha* e aves *Gallus gallus*) em relação aquelas que se alimentaram em dieta com menos alcaloide, confirmando o padrão dose-atividade destes alcaloides característicos de insetos.

Os mecanismos já citados e discutidos utilizados pela mariposa no sequestro destes compostos podem ter importantes implicações funcionais, tais como: (i) alcaloides com ácidos néricos diferentes daqueles do tipo licopsamina que não podem ser transmitidos durante a metamorfose, são recuperados e mantidos pela conversão em “insect PAs” através de transesterificação inseto-específica e da eficiente epimerização dos centros assimétricos (7S) e (3'R); (ii) manutenção e utilização de todos os tipos de bases necinas derivadas da planta pela conversão em “insect PAs”, que podem aumentar o arsenal defensivo contra

predadores da mariposa e, (iii) em arctíneos que sintetizam e emitem o feromônio sexual em machos derivado do alcaloide da planta, a convergência de vários APs sequestrados na biossíntese do hidroxidanaidal é efetuada por “insect PAs” como intermediários em comum. Esse processo necessita de esclarecimento no caso de *S. figulina*, uma vez que não foram realizadas análises em GC-MS para verificar a presença do feromônio.

Este cenário apresenta fortes evidências que reiteram o papel de APs na defesa química de larvas e adultos de *S. figulina* contra diferentes predadores. O aspecto mais interessante desse sistema refere-se à metabolização e a convergência de diferentes APs da planta em insect PAs, bem como a eficiente epimerização inseto-específica dos centros assimétricos C7 e C3'. Estas modificações bioquímicas podem ter sido selecionadas ao longo da história evolutiva dessa interação frente à pressão seletiva de diferentes predadores otimizando a proteção química contra predação em arctíneos neotropicais.

## Referências

- Aplin RT, Benn MH, Rothschild M (1968) Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature* 219: 747-748.
- Aplin RT, Rothschild M (1972) Poisonous alkaloids in the body tissue of the garden tiger moth (*Arctia caja* L.) (Lepidoptera) and the cinnabar moth (*Tyria jacobaeae* L.). In: De Vries A, Kochva E (eds.) *Toxins of animal and plant origin*. Gordon & Breach Science Publication, New York, pp 579-595.
- Biller A, Boppré M, Witte L, Hartmann T (1994) Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*: chemical and chemoeological aspects. *Phytochemistry* 35: 615-619.
- Boppré M (1986) Insects pharmacophagously utilizing defensive plant-chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften* 73: 17-26.
- Boppré M (1990) Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids. Exemplification of complexity in chemical ecology. *J Chem Ecol* 16: 165-185.
- Bowers MD (1992) The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects. In: Roitberg B, Isman MB (eds) *Chemical ecology of insects: An evolutionary approach*, New York, Chapman & Hall, pp. 216-244.
- Bowers MD (1993) Aposematic caterpillars: life-styles of the warningly colored and unpalatable. In: Stamp NE, Casey TM (eds) *Caterpillars*, New York, Chapman & Hall, pp. 331-371.
- Brower LP (1984) Chemical defence in butterflies. In: Vane-Wright RI, Ackery PR (eds) *The biology of butterflies*, London, Academic Press, pp. 109-134.
- Brown KS (1984) Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. *Nature* 309: 707-709.

- Brown KS (1985) Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Rev Bras Biol* 44: 435-460.
- Brückmann M, Trigo JR, Foglio MA, Hartmann T (2000) Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology* 10: 25-32.
- Conner WE, Boada R, Schroeder FC, González A, Meinwald J, Eisner T (2000) Chemical defense: bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14406-14411.
- Conner WE, Weller SJ (2004) A quest for alkaloids: the curious relationship of tiger moths and plants containing pyrrolizidine alkaloids. In: Cardé RT, Millar JG (eds) *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge University Press, New York.
- Després L, David JP, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22: 298-307.
- Diane N, Förther H, Hilger HH, Weigend M (2004) In: Kubitzki K (ed) *Heliotropiaceae. The families and genera of vascular plants, VI. Flowering plants*. Springer, Berlin, pp 62-70.
- Dobler S (2001) Evolutionary aspects of defense: by recycled plant compounds in herbivorous insects. *Basic Appl Ecol* 2: 15-26.
- Dussourd DE, Ubik K, Harvis C, Resch J, Meinwald J, Eisner T (1988) Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5992-5996.
- Edgar JA, Culvenor CCJ, Cockrum PA, Smith LW (1980) Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth “metabolite”. *Tetrahedron Lett* 21: 1383-1384.

- Edgar JA, Boppré M, Kaufmann E (2007) Insect-synthesized retronecine ester alkaloids: precursors of the common arctiine (Lepidoptera) pheromone hydroxydanaidal. *J Chem Ecol* 33: 2266-2280.
- Egelhaaf A, Colln K, Schmitz B, Buck M, Wink M, Schneider D (1990) Organ specific storage of dietary pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Cretonotos transiens*. *Z Naturforsch* 45c: 115-120.
- Eisner T, Meinwald J (1987) Alkaloid derived pheromones and sexual selection in Lepidoptera. In: Prestwich GD, Blomquist GJ (eds), *Pheromone Biochemistry*. Orlando, FL: Academic. pp. 251-269.
- Eisner T, Eisner M (1991) Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid containing moth, *Utetheisa ornatrix*, and its larva, to wolf spiders. *Psyche* 98: 111-118.
- Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 50-55.
- Eisner T, Meinwald J (2003) Alkaloid-derived pheromones and sexual selection in Lepidoptera. In Blomquist GJ, Vogt RG (ed) *Insect pheromone biochemistry and molecular biology*. Academic Press, Florida. pp. 341-368.
- Eisner T (2003). *For love of insects*. Harvard University Press, Cambridge.
- El-Shazly A, Michael Wink (2014) Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the Boraginaceae: Structures, distribution, and biological properties. *Diversity* 6: 188-282.
- Foelix RF (2011). *Biology of spiders*. 3<sup>rd</sup> Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Frei H, Luthy J, Brauchli J, Zweifel U, Wurgler FE, Schlatter C (1992) Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem Biol Interact* 83: 1-22.

- González A, Rossini C, Eisner M, Eisner T (1999) Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5570-5574.
- Hartmann T (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207: 483–495.
- Hartmann T (2009) Pyrrolizidine alkaloids: The successful adoption of a plant chemical defense. In: Conner WE (ed) *Tiger moths and woolly bears. Behavior, ecology, and evolution of the Arctiidae*, Oxford University Press, New York, pp 55-81.
- Hartmann T (2004a) Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* 219: 1-4.
- Hartmann T, Toppel G. 1987. Senecionine *N*-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 26:1639-1643.
- Hartmann T, Biller A, Witte L, Ernst L, Boppré M (1990) Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). *Biochem Syst Ecol* 18: 549-554.
- Hartmann T, Witte L (1995) Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: Pelletier SW (ed) *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, vol 9. Pergamon Press, Oxford, pp 155-233.
- Hartmann T, Ober D (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top Curr Chem* 209: 208-242.
- Hartmann T, Theuring C, Bernays EA (2003) Are insect-synthesized retronecine esters (creatonotines) the precursors of the male courtship pheromone in the arctiid moth *Estigmene acrea*? *J Chem Ecol* 29: 2603–2608.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Ernst L, Singer MS, Bernays EA (2004b) Acquired and partially *de novo* synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. *J Chem Ecol* 30: 229-254.

- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays EA, Singer MS (2005a) Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 1083-1099.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer MS, Bernays EA (2005b) Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 391-411.
- Hartmann T, Ober D (2008) Defense by pyrrolizidine alkaloids: developed by plants and recruited by insects. In: Schaller A (ed) *Induced plant resistance to herbivory*. Springer, New York, pp 213-231.
- Joshi J, Vrieling K (2005) The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. *Ecol Lett* 8: 704-714.
- Klitzke CF, Trigo JR (2000) New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. *Biochem Syst Ecol* 28: 313-318.
- Legendre P, Legendre L (2000) *Numerical ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, Hartmann T (1997) The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur J Biochem* 245: 626-636.
- Macel M (2011) Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochem Rev* 10: 75-82.
- Massuda KF, Trigo JR (2009) Chemical defense of the warningly coloured *Methona themisto* caterpillar (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Eur J Entomol* 106: 253-259.
- Masters AR (1992) Chemical defense in Ithomiinae butterflies (Nymphalidae: Ithomiinae). PhD thesis, University of Florida.

- Mattocks AR (1986) Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London, Academic Press.
- Melo JIM, Sales MF (2004) *Heliotropium* L. (Boraginaceae - Heliotropioideae) de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Rodriguésia* 55: 65-87.
- Melo JIM, Semir J (2008) Taxonomia do gênero *Heliotropium* L. (Heliotropiaceae) no Brasil. *Acta Bot Bras* 22: 754-770.
- Miller JS (2003) A new species of *Heliotropium* L. (Boraginaceae) from Madagascar. *Adansonia* 25: 115-118.
- Naumann C, Hartmann T, Ober D (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6085-6090.
- Nickisch-Rosenegk E, Schneider D, Wink M (1990) Time course of pyrrolizidine alkaloid processing in the alkaloid exploiting arctiid moth, *Cretonotos transiens*. *Z Naturforsch* 45c: 881-894.
- Nishida R (2002) Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 47: 57-92.
- Nogueira-de-Sá F, Trigo JR (2005) Faecal shield of the tortoise beetle *Plagiometriona flavescens* (Chrysomelidae: Cassidinae) as chemically mediated defense against predators. *J Trop Ecol* 21: 189-194.
- Opitz SEW, Müller C (2009) Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* 19: 117-154.
- Pasteels JM, Hartmann T (2004) Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in *Oreina* and *Platyphora* leaf-beetles: Physiological, ecological and evolutionary aspects. In:

- Jolivet P, Santiago-Blay JA, Schmitt M (Eds.) New developments in the biology of Chrysomelidae. SPB, The Hague, pp. 677-691.
- Robinson MH, Mirick H (1971) The predatory behavior of the golden-web spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae). *Psyche* 78:123-139.
- Rossini C, Bezzerides A, González A, Eisner M, Eisner T (2003) Chemical defense: incorporation of diet derived pyrrolizidine alkaloid into the integumental scales of a moth (*Utetheisa ornatix*). *Chemoecology* 13: 199-205.
- Rossini C, González A, Eisner T (2001) Fate of an alkaloidal nuptial gift in the moth *Utetheisa ornatix*: systemic allocation for defense of self by the receiving female. *Insect Physiol* 47: 639-647.
- Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP (2004) Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis warning signals and mimicry. Oxford University Press, Oxford.
- Schulz S, Francke W, Boppré M, Eisner T, Meinwald J (1993) Insect pheromone biosynthesis: stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6834-6838.
- Sehlmeyer S, Wang L, Langel D, Heckel DG, Mohagheghi H, Petschenka G, Ober D (2010) Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the arctiids (Lepidoptera). *PLoS One* 5: e10435.
- Silva KL, Trigo JR (2002) Structure-activity relationships of pyrrolizidine alkaloids in insect chemical defense against the orb-weaving spider *Nephila clavipes*. *J Chem Ecol* 28: 637-648.
- Stegelmeier BL, Edgar J, Colegate SM, Gardner D R, Schoch TK, Coulombe RA, Molyneux R J (1999) Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins* 8: 95-116.

- Trigo JR (2008) Chemical ecology of ithomiine butterflies. In: Epifano F (ed) Current trends in phytochemistry. Research Signpost, Kerala.
- Trigo JR (2011) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem Rev* 10: 83-98.
- Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Barata LES (1993) Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *J Chem Ecol* 19: 669-679.
- Trigo JR, Barata LES, Brown KS (1994) Stereochemical inversion of pyrrolizidine alkaloids by *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae): specificity and evolutionary significance. *J Chem Ecol* 20: 2883–2899.
- Trigo JR, Witte L, Brown KS, Hartmann T, Ernst L, Barata LES (1996a) Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol J Linn Soc* 58: 99-123.
- Trigo JR, Brown KS, Henriques S, Barata LES (1996b) Qualitative patterns of pyrrolizidine alkaloids in ithomiine butterflies. *Biochem Syst Ecol* 24: 181-188.
- Van Den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 11: 463-471.
- Vasconcellos-Neto J, Lewinsohn TM (1984) Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a Neotropical orb-weaving spider. *Ecol Entomol* 9: 337-344.
- Weller SJ, Jacobson NL, Conner WE (1999) The evolution of chemical defenses and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Biol J Linn Soc* 68: 557-578.

- Wink M, Schneider D (1988) Carrier-mediated uptake of pyrrolizidine alkaloids in larvae of the aposematic and alkaloid exploiting moth *Cretonotos*. *Naturwissenschaften* 75: 524-225.
- Witte L, Ehmke A, Hartmann T (1990) Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids; from plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften* 77: 540-543.
- Witte L, Rubico C, Bacch P, Hartmann T (1993) Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry* 32: 187-196.
- Zar JH (2010). *Biostatistical analysis*. 5<sup>th</sup> edition, Upper Saddle River. New Jersey.

Tabela 1. Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos (média  $\pm$  erro padrão) nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Scearctia figulina* e na planta hospedeira *Heliotropium transalpinum*.

Alcaloides pirrolizidínicos	IR	[M <sup>+</sup> ]	Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos (%)					
			Ovos	Larvas	Pupas	Machos	Fêmeas	Planta hospedeira
Retronecina (I) <sup>a</sup>	1484	155	-	1,25 $\pm$ 0,12	0,53 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,09	-
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	1858	218	-	-	-	-	-	0,83 $\pm$ 0,03
tipo 7-Seneciolretronecina (II) <sup>b</sup>	1864	237	-	1,18 $\pm$ 0,21	0,72 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,06	-
Isocreatonotina A (III) <sup>b</sup>	1877	255	0,69 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,07	-
7-Desoxi-1,2-diidrocalimorfina (IV) <sup>b</sup>	1883	283	1,59 $\pm$ 0,20	1,51 $\pm$ 0,09	1,25 $\pm$ 0,21	1,23 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,06	-
7-Desoxicalimorfina (V) <sup>b</sup>	1890	281	1,39 $\pm$ 0,31	1,99 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,07	1,94 $\pm$ 0,31	0,80 $\pm$ 0,05	-

Alcaloides pirrolizidínicos	IR	[M <sup>+</sup> ]	Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos (%)					
			Ovos	Larvas	Pupas	Machos	Fêmeas	Planta hospedeira
tipo 9-Seneciolretronecina (III) <sup>b</sup>	1895	237	-	1,43 ± 0,11	0,84 ± 0,10	1,09 ± 0,06	1,24 ± 0,10	-
Creatonotina A (VI) <sup>b</sup>	1938	255	1,50 ± 0,16	1,97 ± 0,16	1,73 ± 0,28	1,20 ± 0,16	1,4 ± 0,12	-
Supinina (VII) <sup>b</sup>	2020	283	3,76 ± 0,27	6,78 ± 0,33	7,13 ± 0,13	7,27 ± 0,44	8,06 ± 0,59	2,39 ± 0,40
Calimorfina (VIII) <sup>b</sup>	2024	297	12,47 ± 0,78	11,83 ± 1,02	13,75 ± 1,79	14,13 ± 1,70	12,58 ± 1,53	-
Amabilina (IX) <sup>b</sup>	2027	297	-	2,5 ± 0,12	1,91 ± 0,36	2,71 ± 0,57	2,31 ± 0,34	-
3'-Acetilsupinina (X) <sup>b</sup>	2108	325	-	-	-	-	-	5,32 ± 0,85
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2163	355	-	-	-	-	-	1,41 ± 0,29
Intermidina (XI) <sup>b</sup>	2167	299	52,99 ± 1,0	47,26 ± 0,37	48,01 ± 0,52	47,98 ± 2,15	48,41 ± 1,05	-

Alcaloides pirrolizidínicos	IR	[M <sup>+</sup> ]	Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos (%)					
			Ovos	Larvas	Pupas	Machos	Fêmeas	Planta hospedeira
Licopsamina (XII) <sup>b</sup>	2175	299	18,10 ± 0,61	15,92 ± 0,42	17,57 ± 1,04	16,71 ± 0,51	17,04 ± 1,74	-
Rinderina (XIII) <sup>a</sup>	2185	299	-	-	-	-	-	9,11 ± 0,55
3'-Acetilintermidina (XIV) <sup>b</sup>	2220	341	-	1,26 ± 0,08	-	-	-	1,29 ± 0,27
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2231	320	2,99 ± 0,29	2,05 ± 0,10	1,76 ± 0,53	1,95 ± 0,49	2,48 ± 0,50	-
3'-Acetilrinderina (XV) <sup>b</sup>	2245	341	-	-	-	-	-	79,65 ± 1,51
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2543	336	2,42 ± 0,33	2,08 ± 0,22	2,47 ± 0,16	1,40 ± 0,35	1,42 ± 0,41	-
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2581	337	2,10 ± 0,33	1,23 ± 0,19	1,70 ± 0,21	1,13 ± 0,36	1,61 ± 0,30	-

a= coinjeção com substância pura; b= comparação do IR e padrão de fragmentação de massas com a literatura

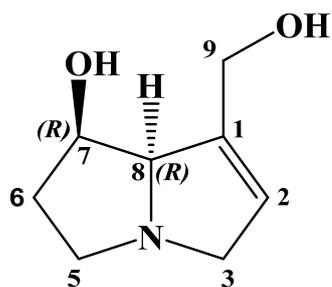
Tabela 2. Padrão de fragmentação de massas, em impacto de elétrons, dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Scearctia figulina* e na planta hospedeira *Heliotropium transalpinum*.

Alcaloides pirrolizidínicos	IRs	Íons diagnósticos (m/z em %)	Referências
Retronecina (I) <sup>a</sup>	1484	[M] <sup>+</sup> 155 (23), 111 (60), 94 (17), 80 (100)	Trigo et al. 1996b
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	1858	138 (100), 93 (91)	
tipo 7-Seneciolretronecina (II) <sup>b</sup>	1864	[M] <sup>+</sup> 237 (4), 137 (20), 136 (16), 111 (30), 94 (23), 93 (9), 80 (100), 55 (38)	Trigo et al. 1996
Isocreatonotina A (III) <sup>b</sup>	1877	[M] <sup>+</sup> 255 (2), 237 (11), 138 (25), 137 (14), 136 (13), 124 (13), 120 (22), 106 (48), 94 (24), 93 (14), 80 (100), 55 (23), 43 (28)	Hartmann et al. 2004b
7-Desoxi-1,2-diidrocalimorfina (IV) <sup>b</sup>	1883	[M] <sup>+</sup> 283 (3), 138 (17), 125(13), 124 (100), 122 (10), 93 (16), 83 (21), 82 (16), 55 (26), 43 (41)	Hartmann et al. 2005b
7-Desoxicalimorfina (V) <sup>b</sup>	1890	[M] <sup>+</sup> 281 (<1), 123 (11), 122 (100), 121 (47), 120 (78), 93 (37), 80 (17), 43 (52)	Edgar et al. 2007
tipo 9-Seneciolretronecina (III) <sup>b</sup>	1895	[M] <sup>+</sup> 237 (2), 154 (10), 138 (20), 137 (21), 136 (17), 94 (26), 93 (100), 80(25)	Trigo et al. 1996b
Creatonotina A (VI) <sup>b</sup>	1938	[M] <sup>+</sup> 255 (3), 211 (7), 139 (15), 138 (99), 136 (12), 124 (13), 120 (11), 94 (40), 93 (100), 80 (25)	Hartmann et al. 2004b
Supinina (VII) <sup>b</sup>	2010	[M] <sup>+</sup> 283 (<1), 140 (6), 123 (23), 122 (100), 121 (38), 120 (49), 108 (12), 93 (21), 80 (11), 43 (11)	Trigo et al. 1996b

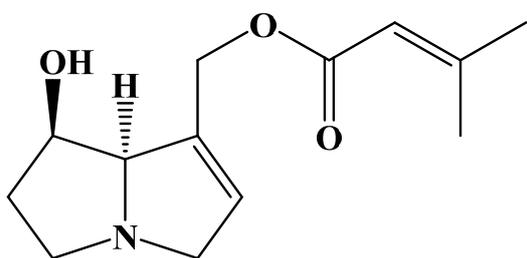
Alcaloides pirrolizidínicos	IRs	Íons diagnósticos (m/z em %)	Referências
Calimorfina (VIII) <sup>b</sup>	2024	[M] <sup>+</sup> 297 (2), 155 (10), 138 (66), 136 (13), 94 (34), 93 (100), 80 (21), 55 (10), 43 (48)	Hartmann et al. 2004b
Amabilina (IX) <sup>b</sup>	2027	[M] <sup>+</sup> 283 (ausente), 123 (22), 122 (100), 121 (41), 120 (55), 108 (11), 93 (24), 80 (15), 43 (25)	Trigo et al. 1996b
3'-Acetilsupinina (X) <sup>b</sup>	2108	[M] <sup>+</sup> 325 (1), 239 (3), 140 (3), 123 (18), 122 (100), 121 (25), 108 (12), 93 (20), 80 (10), 43 (20)	Trigo et al. 1993
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2163	138 (77), 93 (100)	
Intermidina (XI) <sup>b</sup>	2167	[M] <sup>+</sup> 299 (<1), 139 (27), 138 (100), 136 (13), 120 (12), 95 (11), 94 (26), 93 (68), 80 (20), 67 (12), 43 (26)	Trigo et al. 1993, 1996b
Licopsamina (XII) <sup>b</sup>	2175	[M] <sup>+</sup> 299 (<1), 139 (25), 138 (100), 136 (13), 120 (11), 95 (14), 94 (50), 93 (77), 80 (23), 67 (15), 43 (29)	Trigo et al. 1993, 1996b
Rinderina (XIII) <sup>a</sup>	2185	[M] <sup>+</sup> 299 (<1), 139 (28), 138 (100), 136 (16), 120 (12), 95 (16), 94 (23), 93 (68), 80 (20), 67 (12), 43 (25)	Trigo et al. 1993, 1996b
3'-Acetilintermidina (XIV) <sup>b</sup>	2220	[M] <sup>+</sup> 341 (2), 139 (16), 138 (100), 136 (17), 120 (10), 95 (7), 94 (37), 93 (75), 80 (19), 43 (60)	Trigo et al. 1993, 1996b
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2231	138 (62), 93 (100)	
3'-Acetilrinderina (XV) <sup>b</sup>	2245	[M] <sup>+</sup> 341 (1), 139 (19), 138 (100), 136 (11), 120 (7), 95 (5), 94 (22), 93 (65), 80 (15), 43 (40)	Trigo et al. 1993, Trigo et al. 1996b

Alcaloides pirrolizidínicos	IRs	Íons diagnósticos (m/z em %)	Referências
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2543	[M] <sup>+</sup> ausente, 335 (11), 236 (15), 235 (15), 220 (41), 219 (20), 136 (97), 120 (57), 119 (54), 118 (21), 106 (14), 94 (66), 93 (100), 83 (58), 82 (15), 80 (34), 55 (64), 53 (27), 42 (18)	
Alcaloide 1,2-desidropirrolizidínico não identificado	2581	[M] <sup>+</sup> 337 (2), 230 (13), 221 (14), 220 (100), 219 (22), 136 (59), 120 (40), 119 (31), 118 (14), 94 (71), 93 (73), 83 (21), 80 (25), 55 (48), 53 (18)	

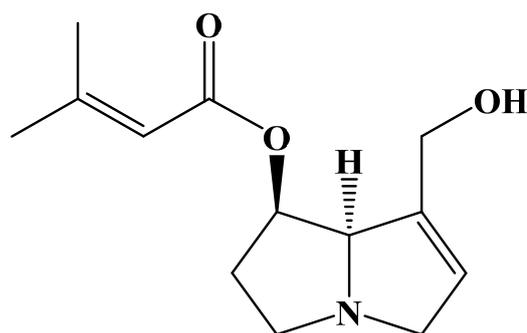
a= coinjeção com substância pura; b= comparação do IR e padrão de fragmentação de massas com a literatura



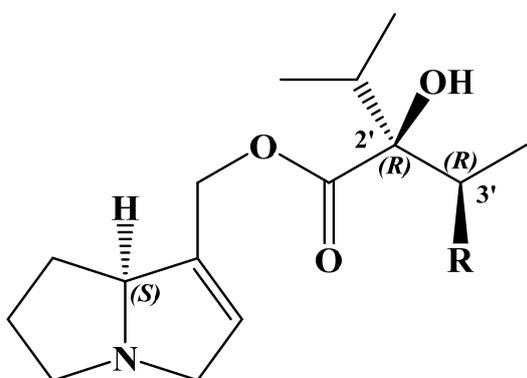
Retronecina (I)



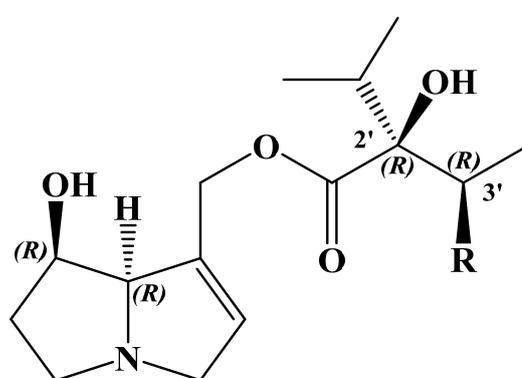
tipo 9-Senecioilretronecina (III)



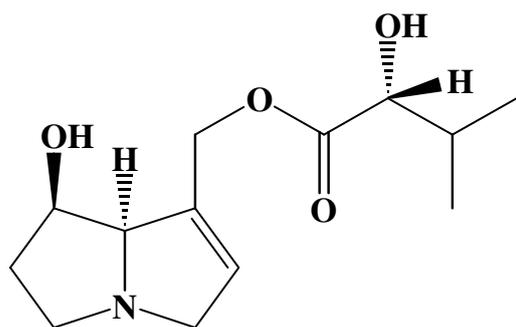
tipo 7-Senecioilretronecina (II)



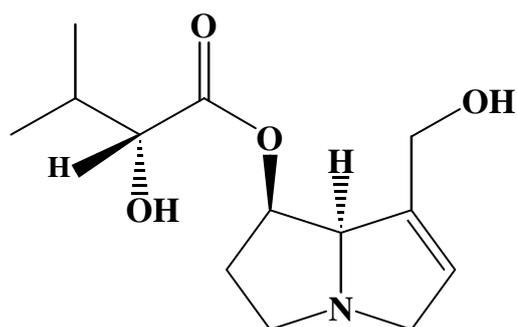
Supinina (VII) - 3'R, R = OH  
 Amabilina (IX) - 3'S, R = OH  
 3'-Acetilsupinina (X) - 3'R, R = OAc



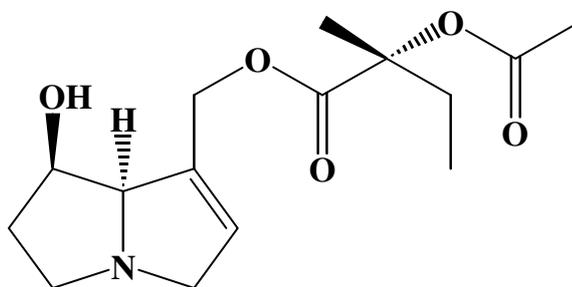
Intermedina (XI) - 7R, 3'R, R = OH  
 Licopsamina (XII) - 7R, 3'S, R = OH  
 Rinderina (XIII) - 7S, 3'R, R = OH  
 3'-Acetilintermedina (XIV) - 7R, 3'R, R = OAc  
 3'-Acetilrinderina (XV) - 7S, 3'R, R = OAc



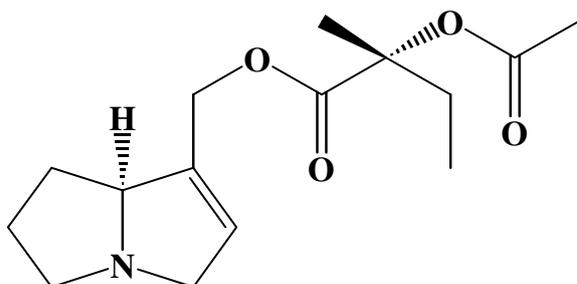
Creatonotina A (VI)



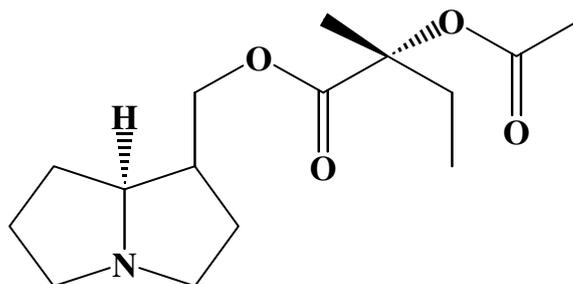
Isocreatonotina A (III)



Calimorfina (VIII)



7-Desoxicalimorfina (V)



7-Desoxi-1,2-dihydrocalimorfina (IV)

Figura 1. Alcaloides pirrolizidínicos encontrados em *Heliotropium transalpinum* e *Scarcia figulina*.



Figura 2. A planta hospedeira, *Heliotropium transalpinum* (A), ovos (B), larvas de 2º instar (C) e adultos (D) da mariposa *Scaerctia figulina*.

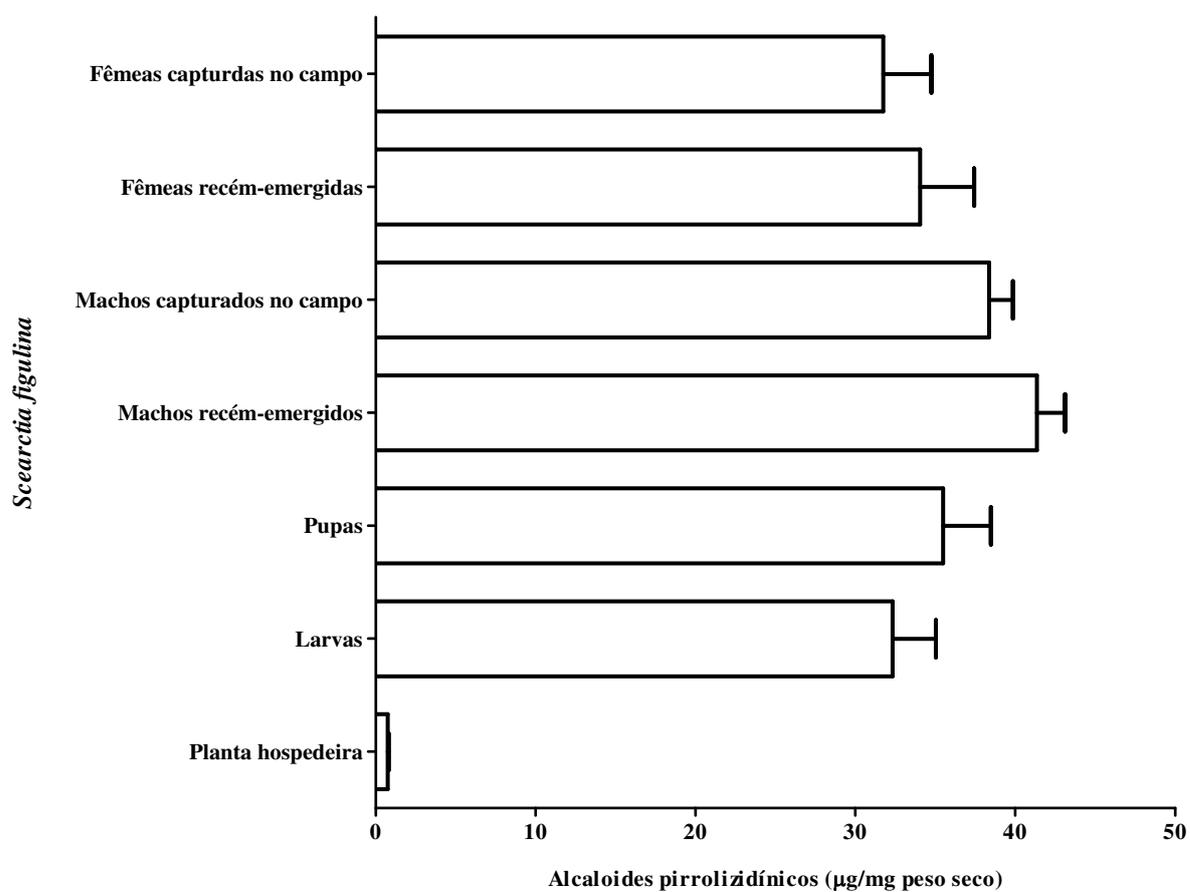


Figura 3. Concentração de alcaloides pirrolizidínicos por *Seiarctia figulina* nos diferentes estágios de desenvolvimento alimentada em folhas de *Heliotropium transalpinum*. Os valores estão representados pela média  $\pm$  erro padrão.

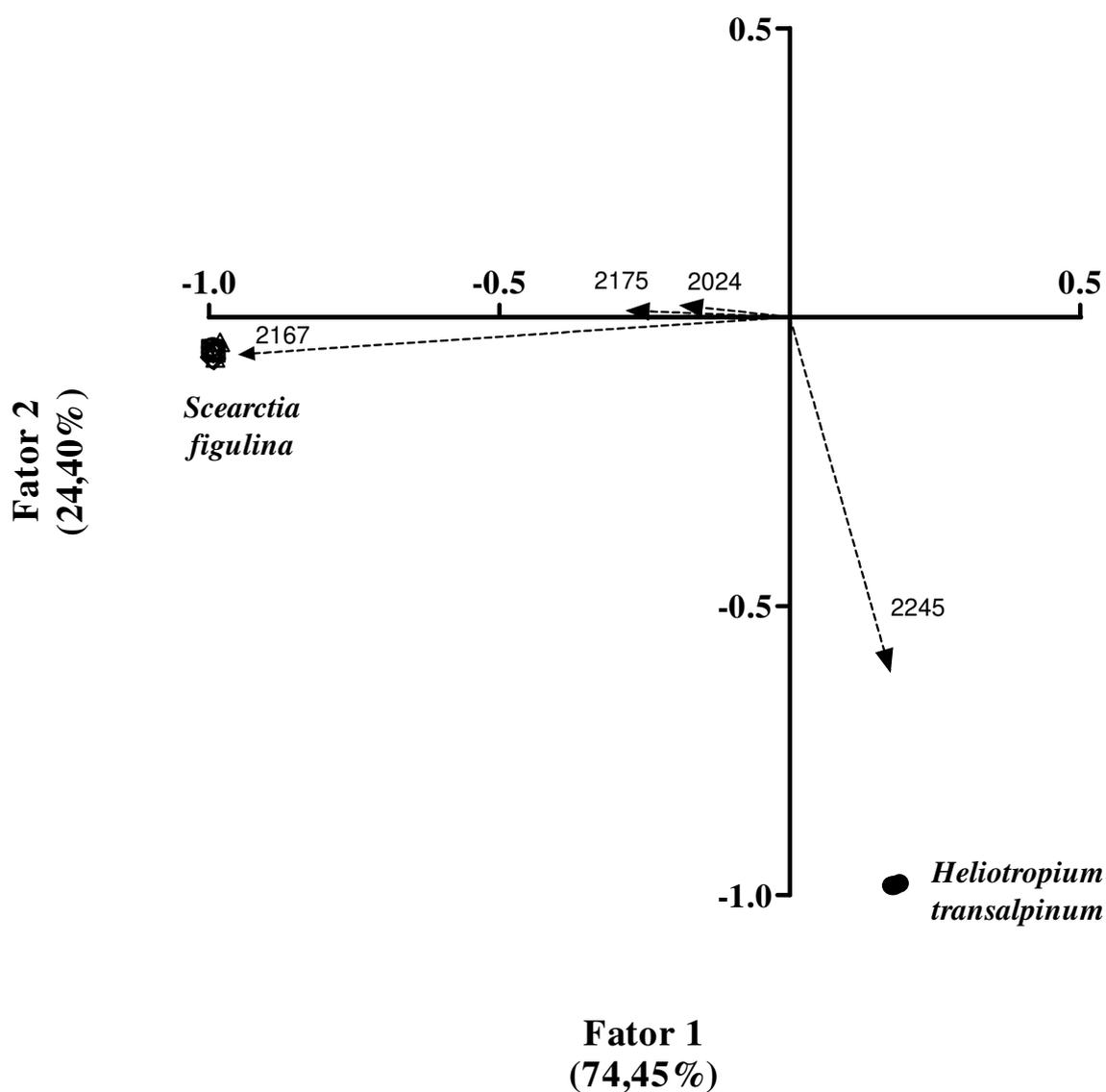


Figura 4. Análise dos componentes principais da abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos em diferentes estágios de desenvolvimento (ovo, larva, pupa, machos e fêmeas) de *Scearctia fugilina*, cujas larvas foram alimentadas em folhas de *Heliotropium transalpinum*. O eixo 1 explica 74,45% da variância total e o eixo 2 explica 24,40%. Os vetores originados no centro da figura representam os alcaloides (descritos pelo índice de retenção) fortemente relacionados com o padrão de componentes principais. Ver os índices de retenção dos alcaloides nas Tabelas 1 e 2.

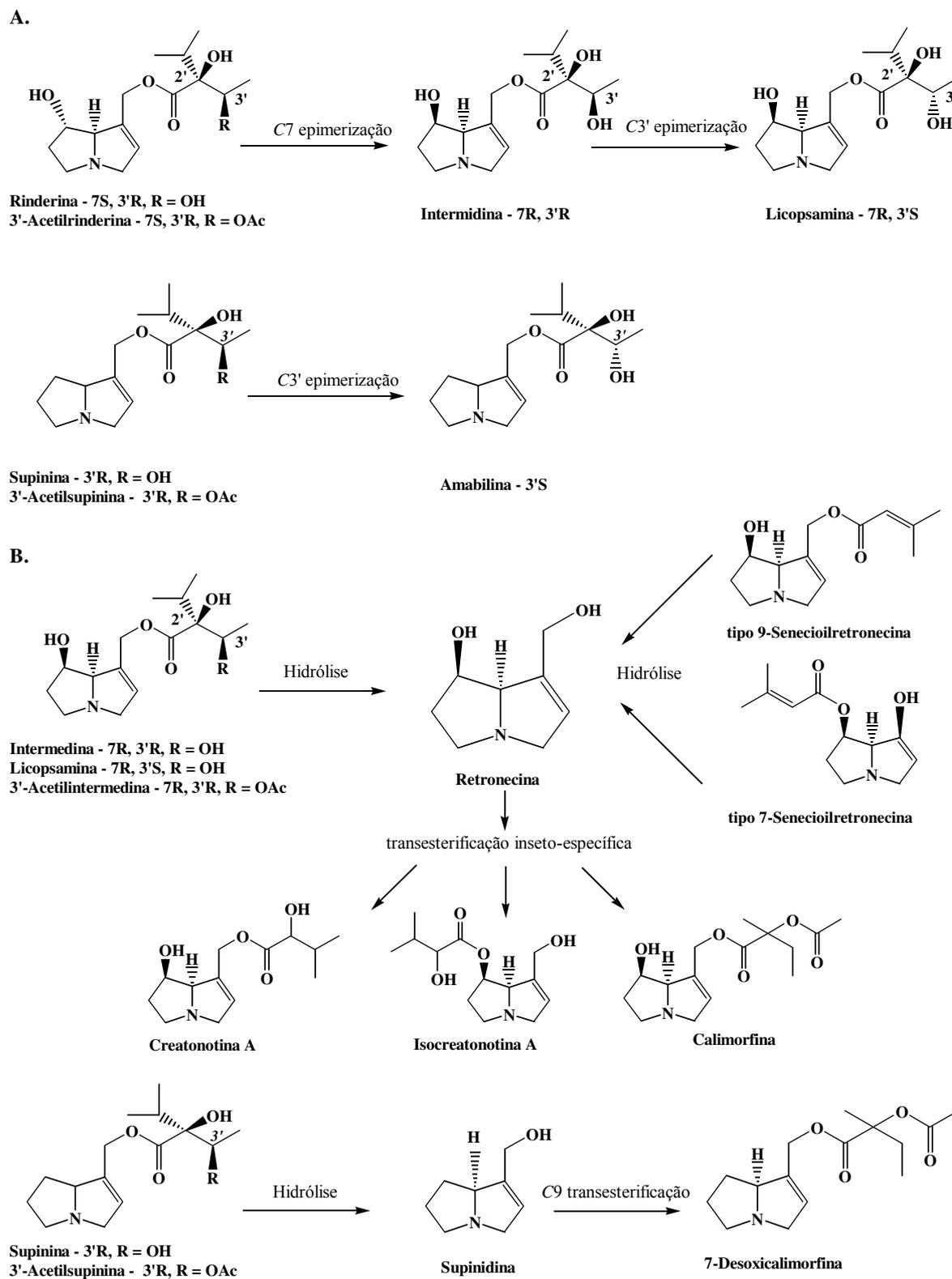


Figura 5. Metabolismo e principais modificações bioquímicas dos alcaloides pirrolizidínicos presentes em *Heliotropium transalpinum* e sequestrados por *Seiarctia figulina* nas diferentes

fases de desenvolvimento: A- Inversão estereoquímica dos centros assimétricos 7S-OH e 3S-OH; B- Sequestro e biossíntese de Insect PAs por meio da transesterificação inseto-específica com os APs da planta com um ácido néxico do próprio inseto.

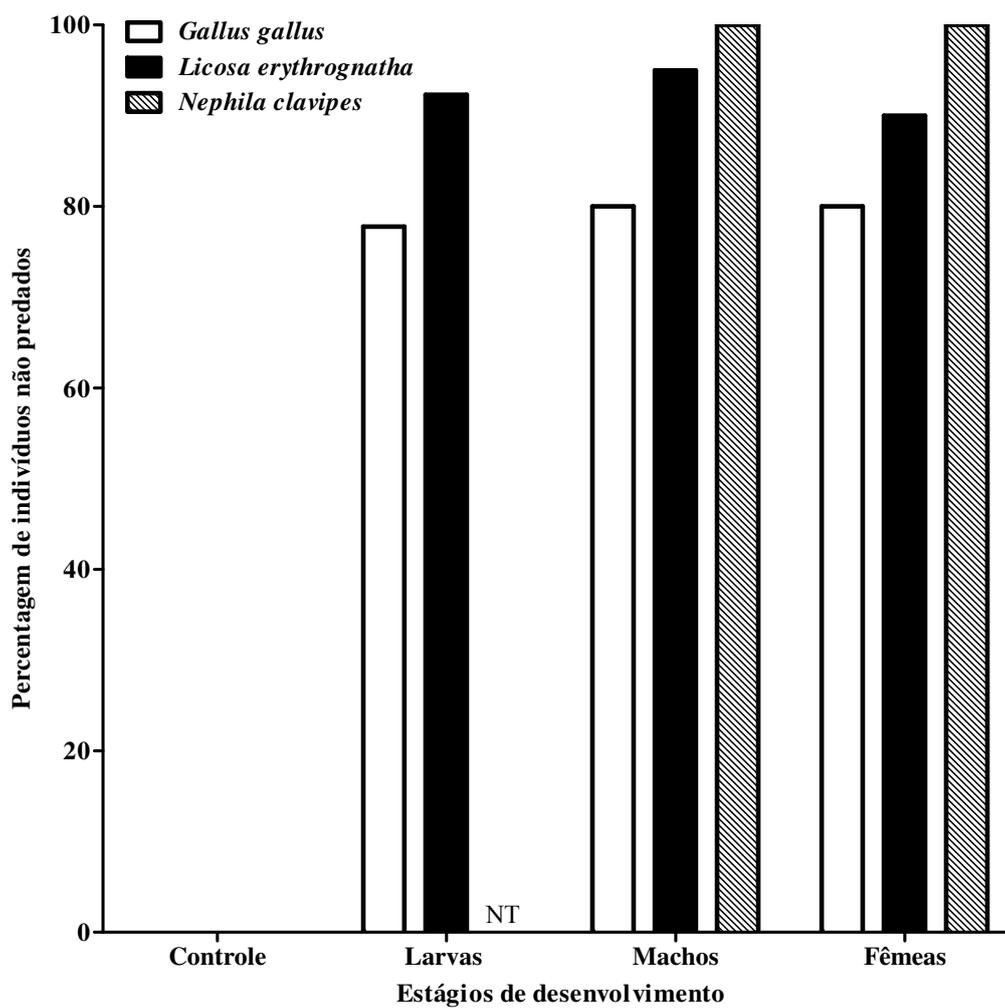


Figura 6. Defesa química de diferentes estágios de desenvolvimento de *Scaerctia figulina* contra diferentes predadores (aves *Gallus gallus* e as aranhas *Lycosa erythrognatha* e *Nephila clavipes*).

## CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho nós estabelecemos uma conexão entre o sequestro e metabolismo de diferentes classes estruturais de APs e o efeito no desempenho de larvas e adultos de arctíneos especialistas neotropicais. Além disso, estudamos a química defensiva das diferentes fases da ontogenia desses lepidópteros contra diferentes predadores. Por meio de uma abordagem experimental multidisciplinar nós esclarecemos e agregamos importantes questões a respeito dos sofisticados mecanismos adaptativos requeridos por esses insetos para a aquisição e utilização de APs de plantas.

Podemos concluir que as espécies de arctíneos utilizados neste trabalho possuem uma elevada plasticidade bioquímica e metabólica em sequestrar diferentes classes estruturais de APs, além de um metabolismo eficiente que permite a transformação, convergência e o armazenamento desses compostos em tecidos estratégicos que conferem proteção química contra predadores vertebrados e invertebrados e a sua utilização na comunicação sexual por machos. Outro aspecto importante que este trabalho mostrou, foi a relação da estrutura dos APs com o efeito no desempenho da mariposa, indicando que diferentes classes de APs podem afetar diferencialmente o consumo e utilização de alimento por um herbívoro especialista associado à eficiência digestiva e metabólica do mesmo. Nós mostramos que o fator determinante na defesa química destes insetos é a concentração de APs em seus tecidos, bem como a estrutura dos APs sequestrados e metabolizados durante o ciclo de vida (atividade dose-dependente e estrutura-dependente). Particularmente no sistema *Crotalaria-U.ornatrix* ocorre uma forte relação com a filogenia da planta hospedeira e a proteção contra inimigos naturais. A transformação e convergência de alguns tipos de alcaloides em insect PAs podem ter sido selecionadas em função de diferentes forças de predação. Esse trabalho mostrou pela primeira vez que estes metabólitos

atuam na defesa química em arctíneos contra predação.

Nossos resultados têm importantes implicações no entendimento de como estes compostos estão mediando às interações ecológicas entre estes organismos e fornece uma base sólida para estudos futuros investigar o sequestro de diferentes APs em outras espécies de arctíneos, tanto especialistas quanto generalistas, direcionados aos aspectos metabólicos e bioquímicos do processamento desses compostos e o papel na defesa química contra diferentes predadores em diferentes fases da ontogenia do inseto.

**ANEXOS**



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "**Alcaloides pirrolizidínicos em mariposas Arctiinae Neotropicais: efeitos sobre o desempenho, sequestro, metabolismo e defesa química contra predadores**", protocolo nº **3347-1(A)**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jose Roberto Trigo / Carlos Henrique Zanini Martins**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **28 de julho de 2015**.

**Vigência do projeto: 03/2008-02/2016**

**Espécie/Linhagem: Aves / Pintinhos brancos**

**No. de animais: 20**

**Peso/Idade: 01 dia / 100g**

**Sexo: machos**

**Origem: Casa de Animais Central Park Rações (Paulínia, SP)**

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 28 de julho de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Alcaloides pirrolizidínicos em mariposas Arctiinae Neotropicais: Efeitos sobre o desempenho, sequestro, metabolismo e defesa química contra predadores**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 21/09/2015

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) autor(a): **Carlos Henrique Zanini Martins**  
RG n.º 35052336-8

Assinatura : \_\_\_\_\_



Nome do(a) orientador(a): **José Roberto Trigo**  
RG n.º 9.944.928-6