



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Extração e identificação de compostos voláteis atraentes para fêmeas de *Anastrepha obliqua*  
(Diptera: Tephritidae)

**Nathaly Costa de Aquino**

Maceió-AL  
2019

**NATHALY COSTA DE AQUINO**

Extração e identificação de compostos voláteis atraentes para fêmeas de *Anastrepha obliqua*  
(Diptera: Tephritidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia, com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal de Alagoas, para fins de obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora:  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Ruth Rufino do Nascimento

Maceió-AL  
2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

A657e Aquino, Nathaly Costa de.

Extração e identificação de compostos voláteis atraentes para fêmeas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) / Nathaly Costa de Aquino. – 2019. 112 f. : il. color.

Orientadora: Ruth Rufino do Nascimento.

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2019.

Inclui bibliografias.

Apêndices: f. 108-112

1. Atrativos sexuais. 2. *Anastrepha obliqua*. 3. Mosca-das-frutas. 4. Frutas - Cultivo. 5. Controle de pragas. I. Título.

NATHALY COSTA DE AQUINO

**Extração e identificação de compostos voláteis atraentes para fêmeas de  
*Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 03/04/2019.

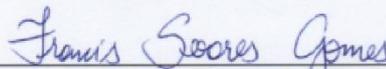
BANCA EXAMINADORA



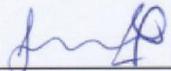
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento  
Orientadora - Universidade Federal de Alagoas - UFAL



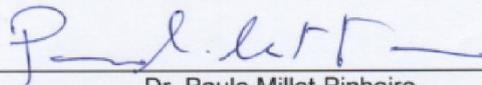
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francis Soares Gomes  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Josealdo Tonholo  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



\_\_\_\_\_  
Dr. Paulo Millet-Pinheiro  
PNPD/CAPES – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho à minha mãe Maria José, minha irmã Liziana Costa e meu esposo Diogo Carlos pelo incentivo, apoio e compreensão. Amo vocês.

“Deus me levanta para alcançar montanhas  
Deus me levanta para andar sobre o mar  
Eu sou forte quando estou sobre Teus ombros  
Deus me levanta mais do que eu possa  
alcançar”

Josh Groban

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me amou sem limites, me ensinou, me guiou e me aconselhou na longa caminhada. Ao Senhor a minha gratidão por não me deixar sair dos seus caminhos;

A minha mãe, Maria José Costa de Aquino, por me educar com amor e exemplo, pelos sonhos que teve que abdicar para que eu pudesse conquistar os meus;

A minha irmã, Liziana Costa de Aquino, que foi minha companheira sonhando todos os dias comigo;

Ao meu amado esposo, Diogo Carlos Henrique, por seu amor, dedicação, cuidado e por caminhar ao meu lado em busca deste sonho. Sem você a caminhada seria solitária e difícil;

A Prof<sup>a</sup> Dr. Ruth Rufino do Nascimento, pela dedicação, paciência, amizade e pelo exemplo como pessoa, que também contribui para minha formação pessoal;

Aos meus amigos, Luana Lima e Raphael Tavares pela paciência, amizade e incentivo. Vocês tornaram a jornada mais leve;

A equipe do laboratório, Jessica de Lima, Claudinete da Silva, Regivaldo de Melo, Raphael Tavares, Rita de Cassia, Cristiane Canuto e Camila Chicuta pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e por todos os momentos divertidos;

A Lucie Vanicková pelo apoio e pelas análises do GC-MS;

A Prof. Dra. Daniela Navarro pelas colaborações nas análises eletrofisiológicas e pelo excelente acolhimento na UFPE;

Ao Dr. Paulo Milet-Pinheiro por toda paciência durante as análises eletrofisiológicas e pela disposição em sempre ajudar;

A Profa. Dra. Fabiane Caxico pela colaboração com os substratos para os testes comportamentais;

Aos técnicos José Joubert de Alencar Gonçalves e a Aldy dos Santos pela amizade e por toda ajuda no decorrer da pesquisa;

Aos professores e professoras do Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia por todo empenho e dedicação que garantiram um ensino de excelência e aos funcionários da Renorbio e da Ufal que fazem com que tudo funcione da melhor maneira possível;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq -, pela concessão da bolsa de estudos;

E a todos que contribuíram de forma direta e indireta no meu desenvolvimento como pessoa e me auxiliaram na realização desta etapa do trabalho.

## RESUMO

A mosca das frutas *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) é uma espécie de importância econômica, causando grandes prejuízos à fruticultura, que são gerados durante uma oviposição feita pelo sexo feminino, causando depreciação, queda prematura e inviabilizando a comercialização e a indústria. A principal técnica usada para monitorar e controlar esses insetos é o uso de armadilhas contendo atrativos de alimentos ou iscas tóxicas; no entanto, a ineficiência e a não viabilidade dessas técnicas demonstram a necessidade de encontrar uma abordagem alternativa para o manejo desses insetos. Nesse cenário, surge uma estratégia adequada ao chamado controle comportamental, que utiliza semioquímicos para atração e captura de insetos-praga. Estas substâncias são produzidas pelo inseto alvo, sendo liberadas em quantidades extremamente pequenas. Há registros de produtos atrativos, como alimentos e feromônios, para moscas-das-frutas de diferentes espécies no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), mas até o momento não há registros de bases de patentes referentes a atrativos para fêmeas de *A. obliqua* geradas a partir de formulações baseadas em compostos voláteis liberados por machos coespecíficos (feromônio sexual) e os emitidos por goiaba, carambola e manga. Para tanto, foram utilizadas duas técnicas analíticas, a Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG) e a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS), para identificar os componentes eletrofisiologicamente ativos. Com base nesses resultados, os bioensaios comportamentais foram posteriormente realizados. As análises revelaram os compostos ativos de EAD nos diferentes extratos. No extrato contendo os voláteis liberados pelos machos foram identificados 5 compostos bioativos, sendo 1-heptanol, linalol, (Z) -3-nonen-1-ol, (E, Z) -3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno. Cinco compostos bioativos, butirato de etila,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -cariofileno também foram identificados no extrato da goiaba. No extrato de carambola, foram encontrados quatro compostos bioativos,  $\beta$ -mirceno, linalol, ocimeno e octanoato de etila, e no extrato de manga,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno foram identificados como compostos bioativos. Os resultados também revelaram compostos comuns em extratos desses frutos hospedeiros e a mistura de feromônios liberada por machos coespecíficos. Portanto, formulações contendo misturas de compostos bioativos foram preparadas e testadas em bioensaios comportamentais realizados em condições de laboratório. Entre as formulações testadas, atratividade semelhante para todas as misturas de compostos ativos de EAD encontrados no feromônio sexual masculino. Com relação às formulações baseadas nos compostos ativos de EAD dos frutos hospedeiros, diferentes resultados foram obtidos para cada fruto estudado. Por exemplo, as misturas de formulações denominadas **M1G**, **M2G**, **M3G**, **M4G** foram tão atrativas quanto o extrato de goiaba e a mistura **M6G** foi mais atraente que o extrato. Em relação às misturas de formulação, baseadas em compostos bioativos de carambola, rotulados como **M1C**, **M2C**, **M3C** e **M4M**, estes foram tão atrativos quanto o extrato de carambola. As misturas formuladas **M2M**, **M3M**, **M4M** e **M5M** derivadas do extrato de manga foram tão atrativas quanto o extrato da fruta. No entanto, a mistura **M1M** foi mais atraente que o extrato de manga. Os resultados de ensaios utilizando formulações contendo misturas de compostos comuns a feromônios sexuais masculinos e extratos de frutos hospedeiros mostram que todas as formulações contendo compostos bioativos de extratos de goiaba e manga foram tão atrativas quanto os respectivos extratos. Duas misturas formuladas, **M3FC** e **M4FC** derivadas de carambola provocaram tanta atratividade quanto o extrato de carambola. Por outro lado, as misturas formuladas rotuladas como **M1FC** e **M2FC** desencadeiam maior atratividade que o extrato de carambola. Assim, é possível concluir que as formulações atrativas para fêmeas de *A. obliqua*, relatadas no presente estudo, apresentam grande potencial para serem empregadas em estratégias de controle dessa praga em pomares infestados.

**Palavras-chave:** Feromônio. Cairomônios. Compostos comuns

## ABSTRACT

The fruit fly *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) is a species of economic importance, causing great damages to fruit growing, which are generated during an oviposition made by females, causing depreciation, premature fall and making the fruit unfeasible for trade and industry. The main technique used to monitor and control these insects is the use of traps containing food attractants or toxic baits; however, the inefficiency and non-viability of these techniques demonstrate the need to find an alternative approach for the management of these insects. In this scenario, appears a suitable strategy the so called behavioural control, which uses semiochemicals for attraction and capture of insect pests. These substances are produced by the target insect, being released in extremely small amounts. There are records of attractive products, such as food and pheromones, for fruit flies of different species at the National Institute of Industrial Property (INPI), but to date, there are no records on patent bases referring to attractants for *A. obliqua* females generated from formulations based on volatile compounds released by conspecific males (sex pheromone) and those emitted by guava, carambola and mango. For this purpose, two analytical techniques, Gas Chromatography coupled to Electroanthenography (CG-EAG) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG-MS) were used to identify the electrophysiologically active components. Based on these results behavioral bioassays were later performed. The analyzes revealed the active EAD compounds in the different extracts. In the extract containing the volatiles released by males 5 bioactive compounds were identified, namely 1-heptanol, linalool, (Z) -3-nonen-1-ol, (E, Z) -3,6-nonadien-1-ol and  $\alpha$ -farnesene. Five bioactive compounds, ethyl butyrate,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -myrcene and  $\beta$ -caryophyllene were also identified in the guava extract. In the starfruit extract, four bioactive compounds,  $\beta$ -myrcene, linalool, ocimene and ethyl octanoate were found, and in the extract of mango,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcene, camphene and sabinene were identified as bioactive compounds. The results also revealed common compounds in extracts of these host fruits and the pheromone mixture released by conspecific males. Therefore, formulations containing mixtures of bioactive compounds were prepared and tested in behavioural bioassays performed under laboratory conditions. Among the formulations tested, similar attractiveness for all mixtures of EAD active compounds found in the male sex pheromone. Regarding the formulations based on EAD active compounds from host fruits, different results were obtained for each fruit studied. For instance, the formulations mixtures named **M1G**, **M2G**, **M3G**, **M4G** were as attractive as the guava extract and the **M6G** blend was more attractive than the extract. Regarding the formulation mixtures, based on starfruit bioactive compounds, labelled as **M1C**, **M2C**, **M3C** and **M4M**, those were as attractive as the starfruit extract. The formulated mixtures **M2M**, **M3M**, **M4M** and **M5M** derived from mango extract were as attractive as the fruit extract. However, the mixture **M1M** was more attractive than the mango extract. The results of assays using formulations containing mixtures of compounds common to male sex pheromone and host fruit extracts show that all formulations containing bioactive compounds from guava and mango extracts compounds were as attractive as the respective extracts. Two formulated mixtures, **M3FC** and **M4FC** derived from starfruit elicited as much attractiveness as the starfruit extract. On the other hand, the formulated mixtures labelled as **M1FC** and **M2FC** trigger higher attractiveness than the starfruit extract. Thus, it is possible to conclude that the attractive formulations for *A. obliqua* females, reported in the present study, present great potential to be employed in strategies to control this pest in infested orchards.

**Key words:** Pheromone. Kairomones. Common compounds

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Morfologia do inseto.....	26
<b>Figura 2</b> – Ciclo de vida das moscas das frutas .....	277
<b>Figura 3</b> – Danos diretos nos frutos de carambola (a), goiaba (b) e laranja (c).....	288
<b>Figura 4</b> – Danos indiretos no fruto de goiaba.....	299
<b>Figura 5</b> – Classificação dos semioquímicos.....	377
<b>Figura 6</b> – Etapas de identificação de semioquímicos .....	411
<b>Figura 7</b> – Extração por aeração.....	43
<b>Figura 8</b> - Cromatógrafo Gasoso acoplado à espectrometria de massas .....	44
<b>Figura 9</b> – Cromatografia Gasosa Acoplada a Eletroantenografia (CG-EAD).....	45
<b>Figura 10</b> – Olfatômetro.....	46
<b>Figura 11</b> – Bioensaio em arena de vidro .....	47

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> – Identificação de compostos EAD-ativos na mistura feromonal liberada por machos de <i>A. obliqua</i> .....	64
<b>Figura 3</b> – Atratividade de fêmeas virgens de <i>A. obliqua</i> para misturas .....	65

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b> - Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de goiaba.....	78
<b>Figura 2</b> - Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de manga.....	79
<b>Figura 3</b> - Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de carambola.....	80
<b>Figura 4</b> - Testes comportamentais com misturas formuladas da goiaba.....	81
<b>Figura 5</b> – Testes comportamentais com misturas formuladas da manga .....	82
<b>Figura 6</b> – Testes comportamentais com misturas formuladas de carambola .....	82

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b> - Atratividade para formulações do fruto de manga .....	97
<b>Figura 2</b> - Atratividade para misturas formuladas com compostos do fruto de goiaba .....	98
<b>Figura 3</b> - Atratividade para formulações com compostos do fruto de carambola .....	98

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b> – Distribuição de espécies do gênero <i>Anastrepha</i> no Brasil.....	244
<b>Tabela 2</b> – Famílias de frutos hospedeiros registrados para <i>Anastrepha obliqua</i> no Brasil..	255
<b>Tabela 3</b> – Tipos de controle empregados em moscas das frutas.....	311
<b>Tabela 4</b> – Tipos de armadilhas utilizadas no monitoramento de moscas das frutas .....	32
<b>Tabela 5</b> – Formas de utilização dos semioquímicos .....	355

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b> – Formulações de compostos EAD ativos nos extratos de goiaba, carambola e manga.....	77
--	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b> – Formulações de compostos comuns aos extratos de manga e dos frutos de goiaba, carambola e manga .....	96
---	----

## **LISTA DE ABREVIACES**

ABRAFRUTAS	Associao Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
SENASA	Servio Nacional de Sanidade Agrária
FAO	Organizao das Naes Unidas para a Alimentao e Agricultura
ANVISA	Agncia Nacional de Vigilância Sanitária
MIP	Manejo Integrado de Pragas
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada  Espectrometria de Massas
CG-EAG	Cromatografia gasosa acoplada ao detector eletroantennogrfico
DIC	Detector de Ionizao de Chamas
TIE	Técnica do Inseto Estéril
PNCMF	Plano Nacional de Combate as Moscas das Frutas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Referências.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Fruticultura brasileira .....	22
2.2 Distribuição geográfica das espécies de moscas das frutas associadas aos hospedeiros no Brasil .....	23
2.3. Descrição e ciclo de vida do inseto .....	25
2.4. Os danos gerados por moscas das frutas .....	27
2.5. Monitoramento e formas de controle de moscas das frutas .....	29
2.6. Semioquímicos para o controle dos insetos .....	33
2.7. Os sinais químicos envolvidos na comunicação de insetos .....	36
2.8. Feromônios.....	38
2.9. Cairomônios .....	39
2.10. Técnicas para a Extração de semioquímicos.....	40
2.10.1. Aeração .....	42
2.10.2. Técnicas para Identificação de semioquímicos .....	43
2.10.2.1. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)...	43
2.10.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector eletroantegráfico (CG-EAG) ..	44
2.10.3. Bioensaios comportamentais .....	45
2.12 Referências.....	48
3. CAPÍTULO I - Identificação do feromônio sexual de <i>Anastrepha obliqua</i> .....	56
RESUMO .....	57
INTRODUÇÃO .....	58
MATERIAIS E MÉTODOS .....	59
Criação de Insetos .....	59
Coleta de feromônio sexual .....	60
Identificação das estruturas dos compostos eletrofisiologicamente ativos por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas .....	60
Obtenção das soluções e formulações dos compostos sintéticos .....	61
Ensaios de laboratório com as formulações.....	62
Análises estatísticas .....	62
RESULTADOS.....	63

Análise da resposta eletrofisiológica de fêmeas de <i>A. obliqua</i> por CG-EAG .....	63
Atratividade de fêmeas de <i>A. obliqua</i> para as formulações.....	65
DISCUSSÃO .....	66
REFERÊNCIAS.....	68
4. CAPÍTULO II - Atração de fêmeas de <i>Anastrepha obliqua</i> para frutos hospedeiros.....	71
RESUMO .....	72
INTRODUÇÃO .....	73
MÉTODOS E MATERIAIS .....	74
Coleta do material biológico e manutenção dos insetos .....	74
Coleta dos voláteis dos frutos.....	74
Testes comportamentais em laboratório.....	76
Análise estatística.....	77
RESULTADOS.....	77
Identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos .....	77
Testes comportamentais com misturas .....	81
DISCUSSÃO .....	83
REFERÊNCIAS.....	87
5. CAPÍTULO III - Atração de fêmeas de <i>Anastrepha obliqua</i> a compostos comuns aos frutos hospedeiros e aos componentes voláteis liberados por machos homoespecíficos.....	91
RESUMO .....	92
INTRODUÇÃO .....	93
MATERIAIS E MÉTODOS .....	94
Coleta do material biológico e manutenção dos insetos .....	94
Coleta dos voláteis dos frutos.....	94
Testes comportamentais em laboratórios .....	95
Análise estatística.....	96
RESULTADOS.....	97
DISCUSSÃO .....	99
REFERÊNCIAS.....	102
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	105
7. APÊNDICES .....	106
Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados do Capítulo I.....	106
Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados do Capítulo II Identificação dos compostos bioativos do extrato de goiaba .....	107

Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados da identificação dos compostos bioativos do extrato de manga .....	108
Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados da identificação dos compostos bioativos do extrato de carambola .....	109
Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados do Capítulo III .....	110

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda social por produtos de fontes naturais que proporcionem melhor qualidade de vida tem crescido ao longo dos anos, entretanto, o processo produtivo agrícola está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos por causa do ataque de alguns tipos de pragas (MELO, 2010; CASSAL *et al.*, 2014). Neste contexto, os países que têm elevado potencial para produção de frutas devido a alguns fatores como extensão territorial e condições climáticas, chegam a investir mais de um bilhão de dólares por ano para o controle de algumas pragas (FACHINELLO *et al.*, 2008; FAO 2013; CROPLIFE, 2017). Em relação aos países importadores, foram criados protocolos de certificação para estabelecer a equivalência dos produtos através das fronteiras garantindo que estes estejam livres de pragas de restrição quarentenária (PINHEIRO *et al.*, 2009; TREICHEL *et al.*, 2016).

Uma alternativa para o controle de pragas que é considerada agricolamente aceitável, devido a sua formulação específica e aos pequenos impactos ambientais quando comparado às outras formas de controle é a utilização de semioquímicos como atraentes (VILELA & MAFRA-NETO, 2001; HASSANALI *et al.*, 2008; RIFFEL & COSTA, 2015). Essa alternativa tem contribuído muito para o conhecimento dos hábitos reprodutivos dos insetos que atacam as plantações de culturas relevantes na fruticultura (CARVALHO *et al.*, 2000; ROMANO, 2009). Assim, grupos de pesquisadores, em nível mundial, vêm trabalhando na identificação dos componentes voláteis como atrativos para diversas espécies de pragas, incluindo as moscas das frutas.

A importância econômica de insetos praga, tais como as moscas das frutas, resulta dos danos provocados nos frutos, os quais são gerados durante a oviposição de fêmeas e o desenvolvimento das larvas no interior dos frutos, tornando-os inapropriados para o consumo, comercialização e industrialização (ALUJA, 1994; MALAVASI *et al.*, 2000; GREGÓRIO *et al.*, 2010). As espécies de moscas das frutas de importância econômica mundial estão agrupadas em seis gêneros: *Ceratitis*, *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Rhagoletis*, *Dacus* e *Toxotrypana* (CUNHA *et al.*, 1993; MALAVASI *et al.*, 2000). No Brasil, os gêneros *Ceratitis* e *Anastrepha* são os mais importantes economicamente, uma vez que algumas espécies, que infestam a maioria das frutas produzidas no país fazem parte destes gêneros (ZUCCHI, 2000).

No gênero *Anastrepha*, *A. obliqua* (Macquart, 1835) destaca-se por apresentar um alto nível de adaptação, desenvolvendo-se nos frutos de manga (*Mangifera indica* L.), jambo (*Jambosa sp*), goiaba (*Psidium guajava* L.) e carambola (*Averrhoa carambola* L.), sendo os

frutos de goiaba, carambola e manga os mais atacados no Estado de Alagoas (GONÇALVES, 2001). Devido a sua polifagia, *A. obliqua* é considerada uma praga de restrição quarentenária que pode reduzir significativamente a produção de algumas culturas, causando danos econômicos que a colocam dentro do manejo integrado de pragas (MAPA, 2017). Em relação a comunicação química, estes insetos utilizam sinais químicos, os quais desempenham papéis diversos e fundamentais na transferência de informações entre indivíduos da mesma espécie ou de espécie diferente, permitindo que possam escolher locais para oviposição, se defendam contra predadores e, no caso dos insetos sociais, organizem suas comunidades (ZARBIN *et al.*, 2009; MACNEIL & MILLAR, 2012). Essa comunicação é mediada por compostos voláteis que podem ter ação feromonal ou cairomonal (ZARBIN, 2001).

Dada a importância dos semioquímicos na comunicação química dos insetos, atualmente, existem registros de produtos utilizados como atraentes alimentares e feromonais como marcação de hospedeiros, aliados ou não a inseticidas, para moscas das frutas de diferentes espécies, incluindo *Bactrocera dorsalis* (US2011290909), *Ceratitidis capitata*, *Anastrepha ludens* (US19874820513, BR8605335, GB2178315, PI 9914748-3 A2) e os atraentes de ação feromonal e cairomonal relacionado a *A. fraterculus* sob os números BR1020150164041 e BR1020160038219, respectivamente. No que se refere a *Anastrepha obliqua*, há uma patente que descreve os constituintes químicos obtidos de voláteis de frutos de goiaba (*Spondias mombim*) empregando o septo de borracha como liberador (PI 0610227-1A2 e US2008030572). Entretanto, até o presente momento o uso de biopolímero como liberadores existem apenas nos registros em bases patentárias, referentes aos atraentes para *A. obliqua* derivados desta tese, que são baseados em compostos voláteis oriundos do feromônio de machos coespecíficos (BR 10 2018 000016 0), dos frutos de goiaba (BR 10 2018 071320 5), carambola (BR 10 2019 004541 8) e manga (BR 10 2018 072563 7) e dos compostos comuns entre os hospedeiros de goiaba, carambola e manga e o feromônio sexual de machos desta espécie (BR 10 2019 004543 4).

Estas patentes foram concebidas pela necessidade de se descobrir formulações atraentes para fêmeas virgens e acasaladas desta espécie baseadas na composição de compostos voláteis oriundos do feromônio de machos e dos frutos hospedeiros preferenciais goiaba, carambola e manga. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo geral, identificar formulações atraentes para fêmeas de *Anastrepha obliqua* oriundas dos compostos voláteis presentes no feromônio sexual e nos frutos de goiaba, carambola, manga e compostos comuns ao feromônio sexual e frutos hospedeiros, os quais podem se tornar potenciais produtos para

serem aplicados sob a forma de formulações específicas e agricolamente aceitáveis para o monitoramento e controle desta praga. Para tanto, inicialmente apresenta-se uma revisão da literatura, seguida pelo capítulo I: Identificação do feromônio sexual de *Anastrepha obliqua*, capítulo II: Atração de fêmeas de *Anastrepha obliqua* para frutos hospedeiros e capítulo III: Atração de fêmeas de *Anastrepha obliqua* a compostos comuns aos frutos hospedeiros e aos componentes voláteis liberados por machos coespecíficos.

Considerando os objetivos descritos na revisão da literatura e nos capítulos 1, 2 e 3 o presente estudo objetivou desenvolver formulações de misturas, em diferentes combinações, para emprego em ensaios comportamentais que foram conduzidos em laboratório objetivando a obtenção de formulações baseadas na composição do feromônio sexual e dos voláteis liberados pelo frutos hospedeiros e dos compostos comuns ao feromônio e aos frutos hospedeiros que possam ser eficazes e viáveis na atração e captura de fêmeas de *A. obliqua*.

## 1.1 Referências

- ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 155-178, 1994.
- CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle Biológico In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p.113-117, 2000.
- CASSAL, Vivian Brusius *et al.* Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.
- CropLife Latin America. Disponível em: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/moscas-de-la-fruta-y-del-boton-floral>. Acesso em 2 de novembro de 2018.
- CUNHA, M. D., COUTINHO, C. D. C., JUNQUEIRA, N. T. V., & FERREIRA, F. R. Manga para exportação: aspectos fitossanitários. **EMBRAPA-SPI**, 1993.
- FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Poda das plantas frutíferas. In: **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.8-13, 2008.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Fao statistical yearbook**. Roma, 307p. 2013.
- GONÇALVES, G. B. **Influência dos constituintes voláteis dos hospedeiros *Averrhoa carambola* L. e *Mangifera indica* L. na composição química das substâncias liberadas por machos de *Anastrepha obliqua* e *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas, 106p, 2001.
- GREGÓRIO, PATRÍCIA LUCIANE FERNANDES; SANT'ANA, JOSUE; REDAELLI, LUIZA RODRIGUES. Percepção química e visual de *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) em laboratório. **Iheringia: série zoologia**. Porto Alegre. Vol. 100, n. 2, p. 128-132, 2010.
- HASSANALI, A., HERREN, H., KHAN, Z. R., PICKETT, J. A., & WOODCOCK, C. M. Integrated pest management: the push-pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1491, p. 611-621, 2008.
- MACNEIL, J. N.; MILLAR, J. G. Chemical communication: pheromone and allelochemical. In: CHAPMAN, R. F. **The insects structure and function**. 5. ed. New York: Cambridge University Press, p. 857-897, 2012.
- MALAVASI, A., A. S. NASCIMENTO, AND J. M. M. WALDER. Implementation of a medfly, fruit fly parasitoids and codling moth rearing facility in northeastern Brazil. No. **IAEA-CN-131**. 2005.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 93-98, 2000.

MELO, Priscilla Siqueira. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

Pinheiro, F. A., de Barros, A. V., & Pinheiro, S. **Processos de certificação para exportação de frutas frescas brasileiras**. In: XXIX encontro nacional de engenharia de produção. Bahia, 2009.

RIFFEL, A.; DA COSTA, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**. 2015.

ROMANO, F. C. Utilização de atrativos alimentares e feromônios no manejo integrado de moscas-das-frutas no Brasil In: MALAVASI, A.; VIRGINIO, J. **Biologia, monitoramento e controle: V Curso Internacional de Capacitação em Moscas-das-Frutas**. Juazeiro, Bahia, 2009.

THEICHEL, M., KIST, B., SANTOS, C., CARVALHO, C., & BELING, R. **Anuário Brasileiro de Fruticultura 2016**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2016.

VILELA, E. F.; MAFRA-NETO, A. **Registro de feromônios comerciais e legislação**. Vilela, EF; Della Lucia, TMC, p. 151-159, 2001.

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. **Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas**, 2nd ed. Holos, Ribeirão Preto, Brasil, p. 45-50, 2001.

ZARBIN, Paulo HG; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, Eraldo R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 13-24, 2000.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fruticultura brasileira

A fruticultura desempenha um papel importante no contexto socioeconômico de um país, dentre estes, tais como a utilização intensiva de mão de obra, o desenvolvimento de agroindústrias e a diminuição das importações (FACHINELLO *et al.*, 2008). Para a economia brasileira, este é um dos setores de maior destaque do agronegócio, o que pode ser justificado pelo elevado potencial para a produção de frutíferas devido à diversidade de clima, solos e condições ecológicas que favorecem a grande variedade de culturas produzidas no Brasil (TREICHEL *et al.*, 2016). Em nível mundial, China, Índia e Brasil representam quase 50% da produção mundial de frutas frescas que totalizam, no ano de 2012, aproximadamente 341 milhões de toneladas de frutas (FACHINELLO *et al.*, 2008; FAO 2013; TREICHEL *et al.*, 2016).

A produção de frutas no Brasil está crescendo significativamente em todos os Estados, com destaque para São Paulo, Bahia e Minas Gerais que foram responsáveis, no ano de 2015, por cerca de 60% da produção de frutas frescas (TREICHEL *et al.*, 2016). No que se refere a exportação, aproximadamente 100 países compram diferentes tipos de frutos brasileiros, que são aceitos no mercado externo devido a sua qualidade e a sustentabilidade do setor (CARVALHO *et al.*, 2017). Segundo a Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados (Abrafrutas), em 2016, foram exportadas 789.889 mil toneladas de frutas frescas ou secas, resultando em uma receita de 702.388 milhões de dólares (CARVALHO *et al.*, 2017). Curiosamente, os Estados que mais produzem frutas no Brasil não são necessariamente os que mais exportam, em 2016 na região Nordeste, os estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia foram os que mais se destacaram por exportarem cerca de 71% dos frutos do produzidos no Brasil (CARVALHO *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, os fruticultores enfrentam o desafio de produzir frutos de qualidade para cumprir novas exigências dos países importadores, uma vez que, o mercado internacional tem adotado protocolos de certificação para estabelecer a equivalências dos produtos através das fronteiras. Os certificados são necessários para o deslocamento de produtos que são potenciais veículos de pragas quarentenárias (PINHEIRO *et al.*, 2009). As pragas quarentenárias são agrupadas em duas categorias, as pragas A1 são as espécies exóticas, não detectadas no país e A2 são pragas de importância econômica potencial, já presentes no país, porém apresentam disseminação localizada e por isso são submetidas a programas oficiais de

controle (MAPA, 2017). Entre as pragas quarentenárias A2, existem as moscas das frutas da família *Tephritidae* que vem causando perdas diretas e indiretas aos fruticultores nas últimas décadas. Em 2015 o Brasil lançou o Plano Nacional de Combate as Moscas das Frutas (PNCMF) que seria implantado até 2018 e previa um investimento de 128 milhões de reais em 10 estados brasileiros, que estão de acordo com a Instrução Normativa N° 24, de 8 de setembro de 2015 (TREICHEL *et al.*, 2016). Os investimentos no controle das moscas das frutas são necessários para ampliar o mercado de exportação brasileiro que sofre com a falta de produtos registrados que sejam eficientes para o controle desta praga (TREICHEL *et al.*, 2016).

## **2.2 Distribuição geográfica das espécies de moscas das frutas associadas aos hospedeiros no Brasil**

Os gêneros de moscas das frutas de ampla distribuição em nível mundial são: *Dacus*, *Bactrocera* (Newman, 1834), *Ceratitis* (Wiedemann, 1824), *Toxotrypana*, *Anastrepha* (Schiner, 1868) e *Rhagoletis* (CUNHA *et al.*, 1993; ZUCCHI, 2000). No Brasil, os gêneros *Bactrocera* e *Ceratitis* estão representados por uma única espécie, enquanto o gênero *Rhagoletis* e *Anastrepha* são representados por 4 e 94 espécies respectivamente. Dentre o gênero *Anastrepha*, sete espécies são particularmente importantes do ponto de vista econômico – *A. grandis* (Macquart), *A. fraterculus* (Wiedemann), *A. obliqua* (Macquart), *A. pseudoparallela* (Loew), *A. sororcula* (Zucchi), *A. striata* (Schiner) e *A. zenilidae* (Zucchi) (ZUCCHI, 2000). A distribuição geográfica de uma espécie está inteiramente relacionada com os hospedeiros que ela é capaz de utilizar como alimento, desta forma a diversidade de gêneros presentes no Brasil reflete suas interações com o hospedeiro e sua ocorrência e adaptações que resultaram das condições ambientais e da competição entre espécies (SELIVON, 2000). As constantes ampliações nas áreas cultivadas com frutas em várias regiões também contribuíram para modificar em algumas décadas o atual quadro biogeográfico das moscas das frutas no Brasil (MALAVASI, 2009).

Os registros apresentados pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) sobre a ocorrência do gênero *Anastrepha* no Brasil, mostram que os estados do Espírito Santo, Amapá, Amazonas e São Paulo são os locais onde foram registrados maior ocorrência de moscas das frutas (Tabela 1). Quando comparadas, todas as regiões brasileiras apresentam registros de espécies do gênero *Anastrepha*, apresentando os maiores registros as regiões norte, nordeste, sudeste, sul e centro oeste, respectivamente.

**Tabela 1** – Distribuição de espécies do gênero *Anastrepha* no Brasil

<b>Região</b>	<b>Estados</b>	<b>Quantidade de espécies do gênero <i>Anastrepha</i></b>
<b>Norte</b>	Acre (AC)	5
	Amapá (AP)	37
	Amazonas (AM)	36
	Pará (PA)	21
	Rondônia (RO)	08
	Roraima (RR)	24
	Tocantins (TO)	16
<b>Nordeste</b>	Alagoas (AL)	3
	Bahia (BA)	31
	Ceará (CE)	04
	Maranhão (MA)	17
	Paraíba (PB)	06
	Pernambuco (PE)	09
	Piauí (PI)	17
	Rio Grande do Norte (RN)	12
Sergipe (SE)	1	
<b>Centro-Oeste</b>	Goiás (GO)	17
	Mato Grosso do Sul (MS)	24
	Mato Grosso (MT)	18
<b>Sudeste</b>	Espírito Santo (ES)	39
	Minas Gerais (MG)	31
	São Paulo (SP)	36
	Rio de Janeiro (RJ)	26
<b>Sul</b>	Paraná (PR)	9
	Rio Grande do Sul (RS)	18
	Santa Catarina (SC)	26

Fonte: <http://www.leva.esalq.usp.br/>. NR-Corresponde a ausência de registros no estado

O gênero *Anastrepha*, de maior ocorrência no Brasil, é nativo das Américas, sendo que das 212 espécies conhecidas, 99 ocorrem no Brasil (AGUIAR-MENEZES *et al.*, 2004; FERRARA *et al.*, 2004; ZUCCHI, 2007; LEAL *et al.*, 2009). Dentre as espécies do gênero *Anastrepha*, as mais polífagas são *A. fraterculus*, desenvolvendo-se em 115 espécies de hospedeiros com preferência por frutos da família Myrtaceae, e *A. obliqua* que se desenvolve em 49 espécies de frutos, principalmente os da família Anacardiaceae (ZUCCHI, R.A. 2012), sendo a manga (*Mangifera indica* L.) o fruto hospedeiro preferencial de *A. obliqua*, tanto no Brasil quanto na Colômbia (MALAVASI *et al.*, 2000; SALDANHA & SILVA, 1999; NORRBOM & KIM, 1988). *Anastrepha obliqua* está distribuída em quase todos os estados

brasileiros, não sendo reportada apenas em Sergipe e Brasília. Quarenta e nove espécies de frutos hospedeiros registrados estão associados a essa espécie nos 25 estados brasileiros (Tabela 2).

**Tabela 2** – Famílias de frutos hospedeiros registrados para *Anastrepha obliqua* no Brasil

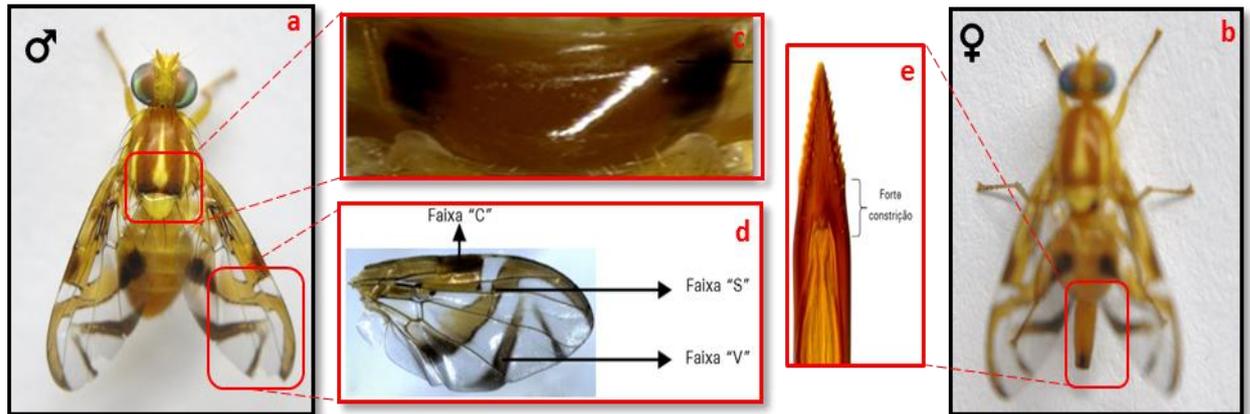
<b>Famílias</b>	<b>Número</b>
Rubiaceae	02
Anacardiaceae	12
Oxalidaceae	01
Malpighiaceae	03
Myrtaceae	24
Rutaceae	02
Rosaceae	02
Apocynaceae	01
Combretaceae	01
Sapotaceae	01

Fonte: [http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/edita\\_ssp\\_i.php](http://www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/edita_ssp_i.php)

### 2.3. Descrição e ciclo de vida do inseto

A identificação taxonômica do gênero *Anastrepha* é feita através de análises morfométricas da cabeça, tórax, mesotórax, asas e a morfologia de acúleos de fêmeas adultas (ZUCCHI, 2000). Nas espécies do gênero *Anastrepha*, os adultos medem cerca de 15 mm de comprimento, são amarelados com tonalidade marrom, especialmente no abdômen, cabeça e pernas. A face dorsal do tórax é de cor castanha amarelada e apresenta três faixas longitudinais amarelo claras (ZUCCHI, 2000; WEENS *et al.*, 2001). O macho apresenta o abdômen arredondado com seis segmentos, enquanto que a fêmea apresenta sete segmentos onde o último é modificado em um apêndice tubular, formando a bainha do ovipositor em formato de faca, medindo cerca de 1,2 mm de comprimento que diferencia a fêmea do macho (Figura 1) (ALUJA, 1994; ZUCCHI, 2000; MALAVASI, 2009; HERNÁNDEZ-ORTIZ *et al.*, 2004). A espécie *A. obliqua* apresenta caracteres morfológicos distintos quando comparado com outras espécies, na asa existe um ramo distal da banda “V” que geralmente é descontínuo, e o mediotergito é formado por uma mancha “desbotada” ou com contornos mal definidos (RORIZ *et al.*, 2015).

**Figura 1** – Morfologia do inseto

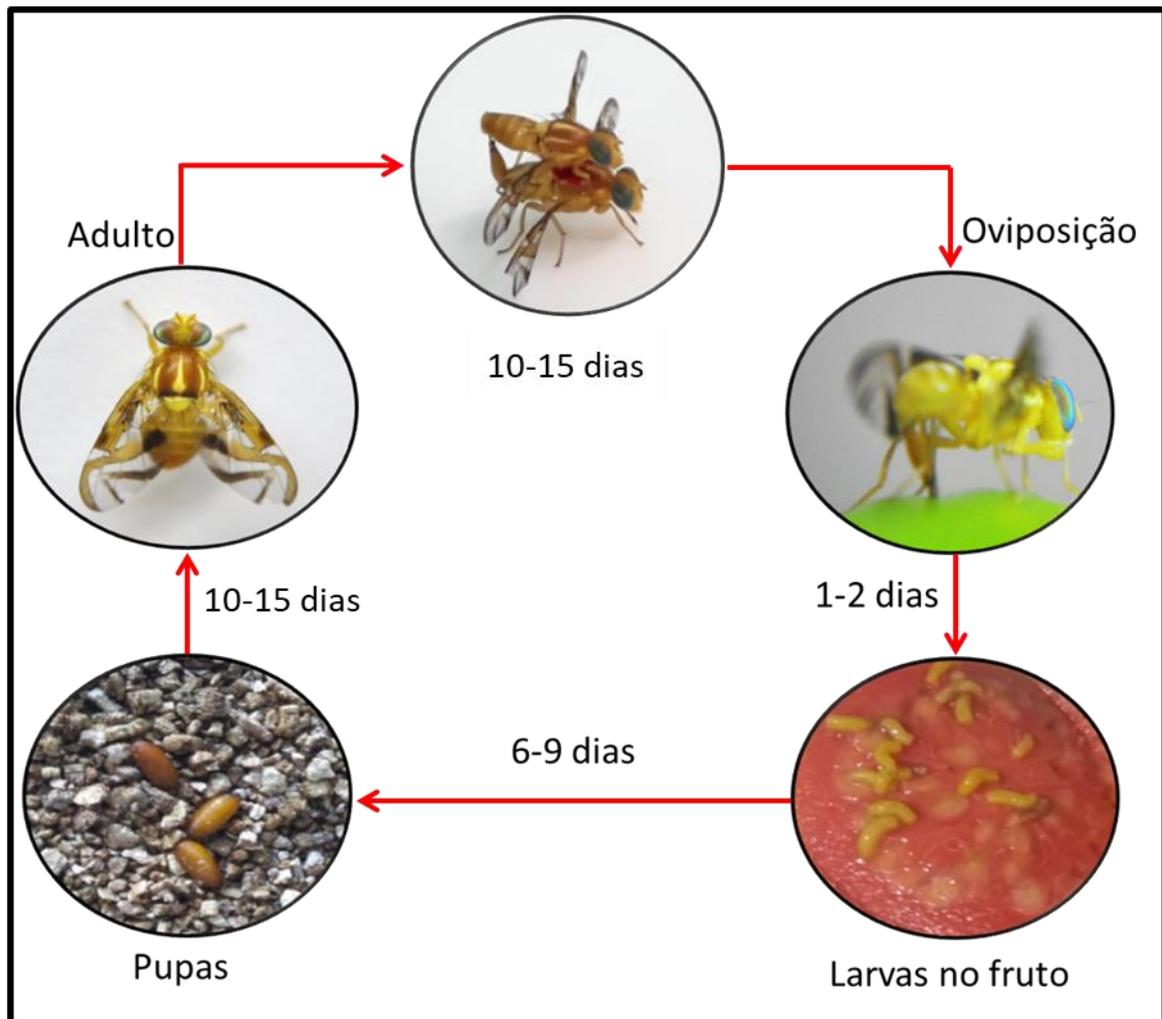


*Macho (a), fêmea (b), mediotergito (c), asa (d), acúleo (e) de A. obliqua*

**Fonte:** Adaptado de RORIZ *et al.*, 2015

No que se refere ao ciclo de vida, as moscas das frutas apresentam metamorfose completa passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). As fêmeas utilizam os frutos em estágios verdes ou próximos à maturação, nos quais realizam puncturas (inserção do acúleo) na casca para a oviposição, ocasionando danos irreversíveis em alguns frutos (MALAVASI, 2009). A fase de ovo ocorre no intervalo de 1 a 2 dias. Ao eclodirem, as larvas, de cor branca a branco-amarelada, apresentam o corpo liso e passam por três instares dentro do fruto, com duração de 6-9 dias, produzindo galerias no interior dos frutos e utilizando a polpa do fruto como fonte alimentar (MALAVASI, 2009). Na última fase da larva, elas saem dos frutos e enpupam no solo na camada que vai de 2 a 6 cm de profundidade (CARVALHO, 2000). O ciclo é completado no período de aproximadamente 30 dias após a emergência dos adultos dependendo de alguns fatores como a temperatura e o clima.

**Figura 2** – Ciclo de vida das moscas das frutas



Fonte: Autora, 2017

#### 2.4. Os danos gerados por moscas das frutas

As moscas das frutas são consideradas como uma das maiores ameaças a fruticultura nacional e mundial devido aos danos provocados em frutos de importância econômica, os quais derivam da oviposição de fêmeas e do desenvolvimento das larvas no interior dos frutos, tornando-os inapropriados para o consumo, comercialização e industrialização (ALUJA, 1994; MALAVASI *et al.*, 2005; GREGÓRIO *et al.*, 2010). Além disso, restrições quarentenárias podem ser impostas a exportação de frutos *in natura*, o que implica em aumento nos custos de produção, desta forma a caracterização de danos gerados por moscas das frutas é importante para a definição de estratégias de controle destes insetos (ARAÚJO *et al.*, 2009). Dentre estes danos, pode-se citar o apodrecimento dos frutos em decorrência da atividade enzimática da flora bacteriana específica do inseto que causa a queda precoce do fruto constituindo assim o dano direto (Figura 3) (AGUIAR-MENEZES *et al.*, 2004;

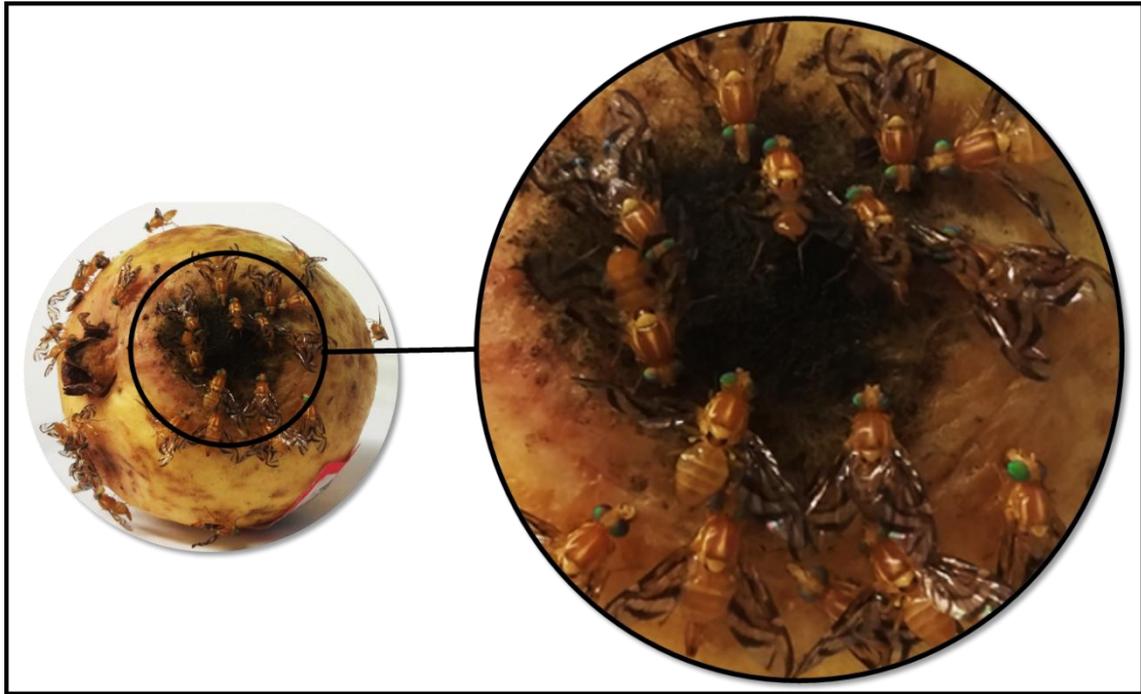
CARVALHO, 2005; NONDILLO *et al.*, 2007). Os danos indiretos são causados por infecções secundárias provocadas por fungos e bactérias, que se alojam no interior dos frutos por causa das aberturas feitas pela oviposição da fêmea (Figura 4) (AGUIAR-MENEZES *et al.*, 2004; CARVALHO, 2005; NONDILLO *et al.*, 2007).

**Figura 3** – Danos diretos nos frutos de carambola (a), goiaba (b) e laranja (c)



Fonte: Autora, 2017

**Figura 4** – Danos indiretos no fruto de goiaba



Fonte: Autora, 2017

Os danos diretos causados por moscas das frutas podem gerar perdas de produção em diferentes níveis dependendo da região, clima e hospedeiros. No Peru, o Serviço Nacional de Sanidade Agrária (SENASA) indica que as perdas de produção de cultivos podem estar entre 30% a 50% e no México, durante os anos 1978 e 2008, foram estimadas perdas no valor de US\$ 435 milhões com frutos de manga (CROPLIFE, 2017). No Brasil estima-se que as moscas das frutas gerem prejuízos da ordem de aproximadamente US\$ 120 milhões ao ano em perdas de colheita, custos de controle e comercialização (TREICHEL, *et al*, 2016). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), mundialmente, os prejuízos causados por tefritídeos totalizam US\$ 1,7 bilhão por ano, sendo que 10% deste montante corresponde os prejuízos registrados no Brasil (FAO 2013).

## **2.5. Monitoramento e formas de controle de moscas das frutas**

O controle eficiente de uma determinada espécie de praga de importância econômica tem que estar baseado no conhecimento da sua flutuação populacional, desta forma, pode-se viabilizar o planejamento de estratégias de manejo mais eficazes (RONCHI-TELES, 2000). Para tanto, é necessário o monitoramento da praga para constatar a abundância e a flutuação populacional das espécies possibilitando as ações de controle de moscas das frutas através da integração de vários métodos, uma vez que essas espécies apresentam características que as

distinguem como pragas-chave, como a alta produção e viabilidade de ovos, capacidade de dispersão de adultos e colonização em diferentes condições ecológicas (SOUZA-FILHO, 2002; CARVALHO, 2005).

A espécie *A. obliqua* é considerada um organismo praga por ser responsável pela redução na produção de algumas culturas causando danos econômicos que a caracterizam dentro do manejo integrado de pragas. Neste sistema, procura-se realizar o controle da praga através do uso integrado dos métodos de controle selecionados com base em parâmetros técnicos (eficácia), econômicos (maior lucro), ecotoxicológicos (preservação do ambiente e da saúde humana) e sociológicos (adaptáveis ao usuário) (PICANÇO, 2008).

As medidas disponíveis para o controle de moscas das frutas envolvem o controle químico através de pulverização; o controle cultural, através da coleta dos frutos caídos; o controle biológico utilizando insetos e microrganismos benéficos e o controle genético através da técnica do inseto estéril (TIE) (Tabela 3) (BRAGA *et al.*, 2001).

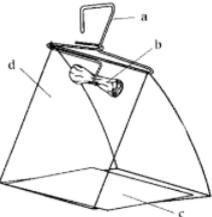
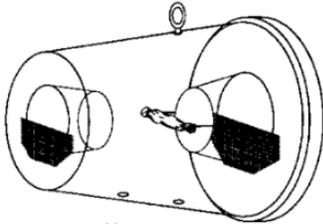
Para o monitoramento de moscas das frutas, os procedimentos a serem adotados obedecem a Instrução Normativa nº 20 de 13 de julho de 2010 que determinam a implantação, manutenção e aplicação de medidas integradas em um enfoque de sistemas para manejo de moscas das frutas, dos quais as principais armadilhas utilizadas são: armadilha adesiva, armadilha McPhail, armadilha Jackson e armadilha Steiner (Tabela 4).

**Tabela 3** – Tipos de controle empregados em moscas das frutas

<b>TIPOS DE CONTROLE</b>	<b>TÉCNICA</b>	<b>USUÁRIO</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>	<b>PARÂMETROS TÉCNICOS</b>
Químico	Uso de iscas tóxicas e/ou pulverizações com inseticidas	Fruticultor/ empresa	Aplicação rápida com período longo de duração no campo	Resíduos tóxicos, ação sobre organismos não alvos e alto custo	Eficiente Sociológico
Biológico	Criação e introdução de inimigos naturais no campo	Empresa	É específico e geralmente, não provoca desequilíbrios no ambiente	Apresenta uma ação mais lenta e alto custo	Eficiente Ecotoxicológico
Cultural	Destruição de frutos caídos de hospedeiros cultivados	Fruticultor	Não deixa resíduos tóxicos	Alto custo e mão de obra	Ecotoxicológico
Genético	Criação massal do inseto praga que se deseja controlar, seguido da esterilização de machos pelo uso de radiação Gama, na fase de pupa	Empresa	Atinge somente a praga alvo Não deixa resíduos tóxicos	Alto custo e dependência de condições geográficas favoráveis para a liberação de machos estéreis.	Eficiente Ecotoxicológico
Semioquímicos	Uso de armadilhas com feromônio ou cairomônio como atraentes	Fruticultor/ empresa	Seletividade às pragas Não tóxico Não poluente Aplicação rápida Uso de pequenas quantidades para o controle	Necessidade de desenvolver metodologia de liberação e dificuldade na determinação dos compostos atraentes	Econômico Eficiente Ecotoxicológico

Fonte: Adaptado de Marques, 2010.

**Tabela 4** – Tipos de armadilhas utilizadas no monitoramento de moscas das frutas

ARMADILHA	TÉCNICA	VANTAGEM	DESVANTAGEM
<p data-bbox="272 371 379 400">Adesiva</p> 	<p data-bbox="518 371 911 663">Feita de madeira ou plástico pintada de amarelo, sobre a parte pintada de amarelo aplica-se uma cola adesiva “sticken” para imobilizar os insetos atraídos e como atrativo utiliza o paraferomônio Trimedlure.</p>	<p data-bbox="938 394 1214 461">Apresenta uma combinação de cores</p>	<p data-bbox="1241 353 1513 678">A eficiência de capturar insetos é reduzida à medida que estes ficam presos na cola, além de perder o poder adesivo com o tempo; poeira e chuvas</p>
<p data-bbox="268 745 384 775">McPhail</p> 	<p data-bbox="518 768 911 1025">Feita de plástico transparente com uma abertura em sua base para a entrada das moscas. Na parte basal é colocado uma solução de proteína hidrolisada para atração das moscas</p>	<p data-bbox="938 768 1214 992">O líquido atraente pode conter inseticida para acelerar a morte da mosca e capturar ambos os sexos</p>	<p data-bbox="1241 757 1513 824">Raio de atração é mais limitado</p>
<p data-bbox="272 1093 379 1122">Jackson</p> 	<p data-bbox="518 1093 911 1485">Formato tipo “delta”, feita de papel rígido, o atraente feromônio ou o paraferomônio Trimedlure é colocado suspenso por um arame no interior da armadilha. Uma lâmina de papel com uma cola “sticken” é colocada na parte inferior da armadilha para captura das moscas atraídas.</p>	<p data-bbox="938 1093 1214 1272">Boa eficiência na captura de moscas das frutas, com fácil manejo e o custo baixo.</p>	<p data-bbox="1241 1093 1513 1417">Em altas populações, a lâmina de papel rígido com o adesivo fica completamente coberta com moscas e perde a eficiência de captura.</p>
<p data-bbox="277 1529 376 1559">Steiner</p> 	<p data-bbox="518 1552 911 1805">Armadilha de material plástico transparente de forma cilíndrica, com orifícios de entrada em cada extremidade em forma de cone invertido, que permitem a entrada, mas evitam a saída do inseto.</p>	<p data-bbox="938 1552 1214 1765">Capturar um elevado número de insetos, sem diminuir sua capacidade de captura, como ocorre em outros modelos</p>	<p data-bbox="1283 1641 1469 1675">Elevado custo</p>

Fonte: Adaptado de Sobrinho *et al.*, 2001; Marques, 2010

Diante do exposto, novas técnicas que conservem os recursos naturais e mantenham a qualidade ambiental, ecológica e sejam economicamente viáveis devem ser implementadas. Para tanto, uma das ferramentas que obedecem a esses critérios é conhecida como Manejo Integrado de Pragas (MIP) (NARANJO *et al.*, 2015). O MIP deve apresentar: o desenvolvimento de materiais mais resistentes através do melhoramento genético, o emprego de semioquímicos, sendo os feromônios e os caïromônios os mais usados e a utilização de agentes de controle biológico, como por exemplo, os inimigos naturais (HASSANALI *et al.*, 2008; RIFFEL & DA COSTA, 2015).

## **2.6. Semioquímicos para o controle dos insetos**

O conhecimento da ecologia química de inimigos naturais, dos herbívoros e das plantas hospedeiras é fundamental para o desenvolvimento das estratégias para um MIP efetivo. Uma das formas de utilização do MIP é o uso dos semioquímicos como forma de controle através de armadilhas com feromônio ou caïromônio como atraentes (Tabela 5). No que se refere aos feromônios, existem duas formas de utilização, para o monitoramento ou controle do nível e dano econômico.

Pesquisas, baseadas na utilização de semioquímicos para o controle de pragas, vêm sendo realizadas em todo o mundo contemplando estudos com 103 dos 447 insetos-praga do agronegócio brasileiro (ZARBIN *et al.*, 2009). A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, possui registros de 338 produtos para controle de insetos-praga dentre os quais 298 são inseticidas, 12 biológicos e 28 feromônios. Os dípteros constituem a quarta ordem de insetos com a maior quantidade de espécies-praga no Brasil, as quais compreendem 18 espécies associadas a 6 famílias distintas, dentre as quais encontram-se *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha obliqua*, *Ceratitidis capitata* e *Bactrocera carambolae* (ZARBIN *et al.*, 2009).

Um dos principais gargalos do uso do semioquímicos, como forma de controle de insetos-praga é a liberação destes compostos, visto que estes possuem alta volatilidade. Por este motivo, é necessário que sejam determinados parâmetros como a taxa de liberação e/ou composição do atraente de modo a garantir a efetividade na atração. Os liberadores utilizados para semioquímicos são diversos, com destaque para o septo de borracha que possui sistemas matriciais, onde os semioquímicos estão adsorvidos em uma espécie de rede formada por cadeias de uma ou várias substâncias químicas polimerizadas, denominada matriz, que atua

como agente modulador da liberação (MUÑOZ-PALLARES *et al.*, 2001). Um outro tipo liberador são os polímeros naturais, que tem como característica uma degradação não-tóxica, proveniente da desacetilação da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto de animais como crustáceos, moluscos e insetos (ANGELOVA & HUNKELER, 1999).

Tabela 5 – Formas de utilização dos semioquímicos

	Monitoramento	Coleta massal	Confusão sexual	Push-Pull	Atrai e Mata
Objetivo	Refletir as mudanças na densidade populacional permitindo estimar o local e época em que a atividade dos insetos será máxima	Realizar a captura de insetos através de armadilhas, contendo feromônios	Impregnar uma determinada área com feromônios sintéticos, com o intuito do rompimento do sistema normal de comunicação entre os indivíduos	Utilização de estímulos atrativos e repelentes para manipular a distribuição e o comportamento do inseto	Utilizar o feromônio junto com inseticida que atrai e mata o inseto que entra em contato
Forma de uso	Uso de armadilhas com feromônio e dependendo da densidade de insetos decide-se pela aplicação ou não do inseticida	Armadilhas com feromônio para remover um número significativo de indivíduos	Utilização de armadilhas com grande quantidade de feromônio sintético impossibilitando o inseto de seguir a pluma de feromônio natural	Composto de uma cultura principal que é protegida por pistas de localização negativas (que afasta), que resulta em redução da infestação pela praga ou em alteração do seu desenvolvimento	Armadilhas com feromônio e inseticida, aumentando a chance de contato do inseto ao inseticida
Espécies estudadas	<i>Cydia Nigricana</i> (Tortricidae)	<i>Rhynchophorus palmarum</i> (Curculionidae)	<i>Plodia interpunctella</i> (Pyralidae)	<i>Sitona lineatus</i> (Curculionidae)	<i>Grapholita molesta</i> (Tortricidae)

Fonte: Adaptado de Baker, T.C. 2009; Goulart *et al.*, 2015; Larsson, 2016

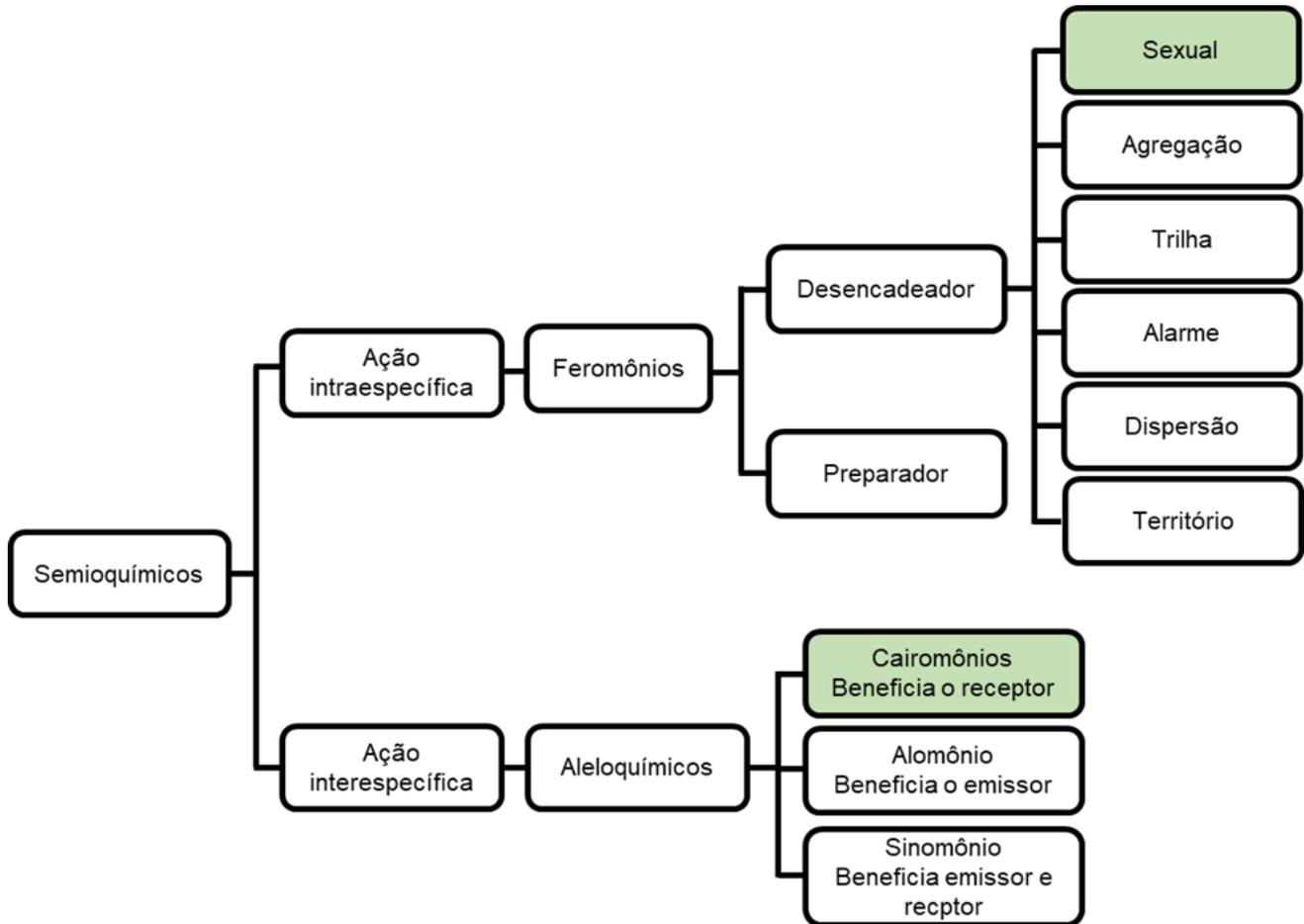
## 2.7. Os sinais químicos envolvidos na comunicação de insetos

Um dos mais importantes tipos de comunicação que os insetos e outros organismos utilizam é a comunicação química. Os insetos são exímios usuários de sinais químicos, os quais desempenham papéis diversos e fundamentais na transferência de informações entre indivíduos da mesma espécie ou de espécie diferente (MACNEIL & MILLAR, 2012). As substâncias químicas reconhecidas pelos insetos permitem que os mesmos encontrem parceiros para o acasalamento, alimento ou presa; escolham locais para oviposição, se defendam contra predadores e, no caso dos insetos sociais, organizem suas comunidades (ZARBIN *et al.*, 2009).

Os compostos envolvidos na comunicação química dos insetos, em sua maioria, são detectados através do uso das suas antenas que é um órgão especializado na captação e transmissão de estímulos olfativos e mecânicos. Podendo discriminar mudanças na concentração do composto, na composição e na sua isomeria, o que confere a antena uma excelente especificidade e sensibilidade (MORAES *et al.*, 2008). O indivíduo receptor da mensagem química utiliza os compostos como gatilhos fisiológicos para reações comportamentais específicas, onde a recepção do sinal químico é baseada na ligação temporária de moléculas a um receptor específico (MORAES *et al.*, 2008).

Os semioquímicos são classificados como qualquer substância química que, quando liberada por um determinado organismo provoca uma mudança fisiológica e/ou comportamental em outro organismo (ZARBIN, 2001). Estes sinais químicos são subdivididos segundo o tipo de interação interespecífica ou intraespecífica nos quais estão envolvidos e, com base nos custos e benefícios que trazem para cada organismo envolvido na interação, sendo classificados como, feromônios e aleloquímicos (Figura 5) (ZARBIN, 2001).

**Figura 5** – Classificação dos semioquímicos



**Fonte:** Adaptado de Corrêa & Sant’Ana, (2001).

As substâncias classificadas como feromônios podem agir como atraentes sexuais, marcadores de trilhas, propiciar comportamentos de agregação, alarme, dispersão, dentre outros. Os aleloquímicos, por sua vez, diferenciam-se de acordo com o tipo de organismo beneficiado na comunicação e estão subdivididos em três classes, a saber: cairomônios, sinais químicos que quando liberados beneficiam somente o receptor da mensagem; alomônios, sinais químicos que somente favorecem o emissor do sinal químico e os sinomônios que favorecem tanto o agente emissor como o receptor do sinal (NORDLUND & LEWIS, 1976; DICKE & SABELIS, 1992).

## 2.8. Feromônios

Os feromônios são moléculas que evoluíram como um sinal entre organismos da mesma espécie e em sua maioria constitui uma combinação específica de moléculas pertencentes a grupos funcionais distintos que causam reações comportamentais ou fisiológicas específicas dependendo do contexto e do receptor (TILLMAN *et al.*, 1999; WYATT, 2014). Durante esta comunicação química ocorre a evaporação passiva do feromônio a partir de uma glândula de superfície exposta, entretanto adaptações comportamentais e morfológicas específicas tornam o processo de liberação de feromônio, em alguns insetos, ainda mais eficiente (BOLSSET & WILSON, 1963; AYASSE *et al.*, 2001; JOHANSSON & JONES, 2007). A mensagem que um feromônio transmite tem um papel importante como mediador de comunicação podendo percorrer uma determinada distância em função de sua estabilidade no ar, volatilidade, velocidade de difusão, eficiência olfativa do receptor e das correntes de vento (COSTA, 2016).

O uso de feromônios para atração de moscas das frutas, foi reportado para 4 espécies do gênero *Anastrepha*: *A. suspensa*, *A. ludens*, *A. obliqua* e *A. fraterculus* (NATION 1983, 1990; BATTISTE *et al.*, 1983; ROCCA *et al.*, 1992; HEATH *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001; LÓPEZ-GUILLEN *et al.*, 2011). A composição química dos extratos de machos e de suas respectivas glândulas salivares foram investigadas para duas espécies do gênero *Anastrepha*, *A. fraterculus* (LIMA *et al.*, 2001) e *A. obliqua* (GONÇALVES *et al.*, 2013). No estudo com a espécie *A. obliqua*, observou-se que durante a liberação do feromônio, os machos emitem compostos voláteis que atraem fêmeas e machos coespecíficos (LÓPEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Os machos podem responder ao feromônio de machos coespecíficos para obter acesso a recursos como o alimento, mas é mais provável que utilize o mesmo sítio de sinalização para localizar e cortejar as fêmeas (BORDEN, 1977, 1984, 1993).

A análise dos extratos contendo os constituintes químicos liberados por machos de duas populações selvagens de *A. obliqua*, oriundas de frutos hospedeiros distintos, e de suas respectivas glândulas salivares revelou a presença de álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e terpenos. No total, 36 compostos foram identificados nos extratos de ambas as populações e uma análise comparativa entre os extratos de aeração de machos provenientes de hospedeiros diferentes revelou um percentual de similaridade de aproximadamente 60% em sua composição (GONÇALVES, 2013).

A importância da identificação do feromônio está, dentre outros fatores, relacionada com o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que propõe o uso dos feromônios sexuais sintéticos nas técnicas de coleta massal, confusão sexual e em armadilhas atraindo e mata, com o objetivo de manter os níveis populacionais abaixo do nível de dano econômico (ARIOLI *et al.*, 2013; JONES, 2014). Atualmente, existe no mercado os paraferomônios que atraem especificamente machos de apenas uma determinada espécie de moscas das frutas, a saber: o metil eugenol que é empregado no controle da mosca do oriente, *Bactrocera dorsalis* (Dacus); o cuelure para a mosca-oriental-do-melão, *Bactrocera cucurbitae*, e o Trimedlure para a mosca-do-Mediterrâneo, *C. capitata* (SILVA, A.C., 2009). Entretanto, para as espécies de *Anastrepha* não existe registro do uso de paraferomônios para realização do controle (RAGA *et al.*, 1997).

## 2.9. Cairomônios

A comunicação química entre moscas das frutas e frutos hospedeiros é de fundamental importância para compreender o comportamento destes insetos. As plantas hospedeiras desempenham um papel fundamental no comportamento reprodutivo destes insetos e os compostos voláteis produzidos por elas podem atuar como percussores do feromônio sexual produzido por machos, mediante o consumo, absorção ou inalação do material vegetal da planta hospedeira ou podem atuar aumentando a eficácia de atração do feromônio sexual (efeito sinérgico) para fêmeas (LANDOLT, 1997). O feromônio sexual dos insetos fitófagos associados aos compostos voláteis liberados pelos hospedeiros, pode ter ação direta ou indireta sobre a fisiologia e o comportamento do inseto, que refletem nas estratégias utilizadas pelos mesmos para otimizar o acasalamento e a reprodução (LANDOLT, 1997). Além disso, os cairomônios podem atuar sobre os sistemas nervosos e hormonal dos insetos.

Em um estudo realizado com *A. obliqua* observou-se que os comportamentos sexuais apresentados por esta praga são influenciados pelos compostos voláteis liberados por alguns hospedeiros, dentre eles o cajá e a manga (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; LÓPEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011; MALO *et al.*, 2012; REYES *et al.*, 2017). Além disso em ensaios comportamentais, ambos os sexos de *A. obliqua* foram igualmente atraídos para os voláteis destes frutos (ORTEGA-ZALETA & CABRERA-MIRELES, 1996; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009; MALO *et al.*, 2012; LÓPEZ-LEY *et al.*, 2015).

No que se refere a composição do feromônio desta espécie, as análises dos extratos de aeração e de glândulas salivares de machos de *A. obliqua*, proveniente do fruto hospedeiro

manga, demonstraram que 10 componentes estão presentes tanto no extrato de aeração quanto no extrato de glândulas salivares. Observou-se ainda que 15 compostos são comuns aos extratos de aeração e de glândulas salivares de machos de *A. obliqua*, provenientes do fruto hospedeiro carambola (GONÇALVES *et al.*, 2013). A semelhança entre a mistura feromonal e os compostos liberados pelo hospedeiro pode ser um resultado do sequestro e armazenamento de compostos do fruto hospedeiro, durante a alimentação de larvas e de adultos selvagens destes insetos, influenciando diretamente na mistura de compostos a ser liberada pelos machos sexualmente maduros (ETGES *et al.*, 2006; VANÍCKOVÁ *et al.*, 2012a; VANICKOVÁ *et al.*, 2012b).

## **2.10. Técnicas para a Extração de semioquímicos**

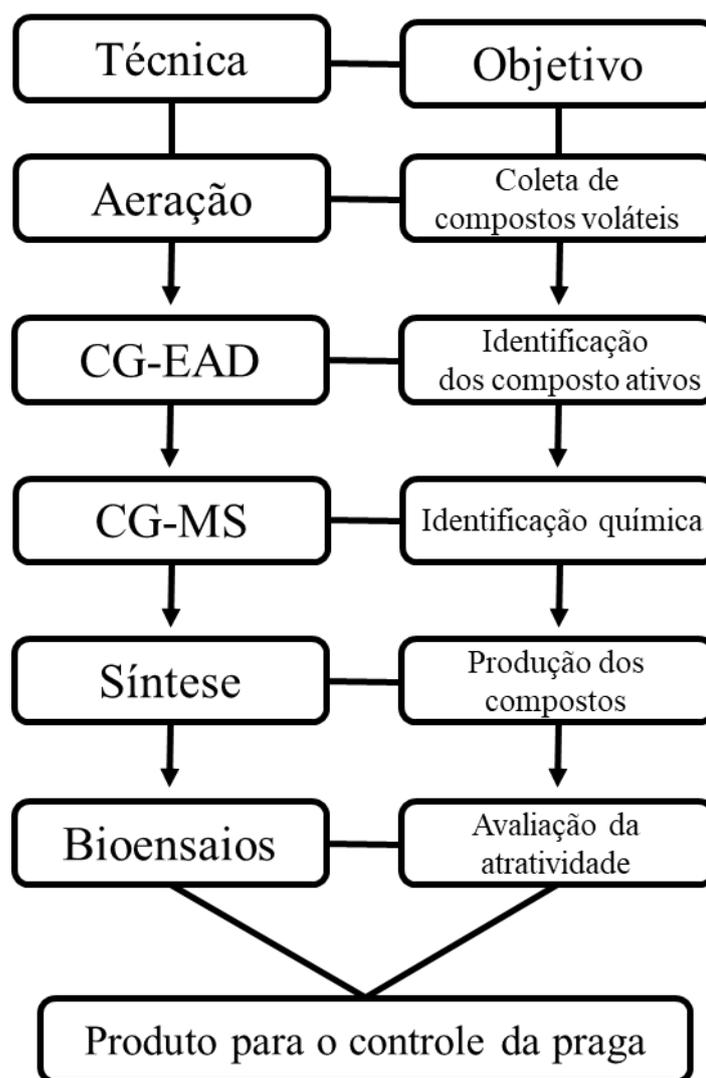
Os semioquímicos agem em concentrações baixas influenciando quase todos os aspectos da vida dos insetos, tais como alimentação, comportamento sexual, agregação e oviposição. A identificação dessas substâncias (feromônios e aleloquímicos), aliada à observação do modo de vida do inseto, serve como um valioso método no manejo e controle de pragas, por meio da manipulação comportamental das mesmas. Existe uma grande variedade de métodos e técnicas para extrair e identificar semioquímicos, e uma das principais preocupações é o fato de que estas substâncias são produzidas e liberadas pelos insetos em quantidades diminutas (nanogramas a microgramas), sendo moléculas orgânicas com centros quirais e/ou insaturações e ramificações, e apresentando baixo peso molecular, o que garante a volatilidade da molécula (THOMAZINI, 2012).

Os métodos de extração e identificação de substâncias voláteis de insetos e plantas ou frutos hospedeiros foram relatados por Zarbin (2001), o qual reportou que a maior dificuldade para extração e identificação destas substâncias está diretamente relacionada a produção das mesmas em baixa quantidade, a presença de vários outros compostos inativos, juntamente com as substâncias bioativas.

A primeira etapa para a identificação de semioquímicos consiste no estudo do comportamento do inseto para definição do sexo liberador do feromônio, o horário de chamamento, o comportamento reprodutivo (envolve os comportamentos de corte, acasalamento e oviposição) e a definição dos frutos hospedeiros preferenciais. Uma vez coletadas estas informações, procede-se com a extração ou coleta de compostos voláteis liberados ou produzidos pelo emissor da mensagem química através da técnica de aeração ou

headspace dinâmico. Posteriormente, os compostos bioativos extraídos são detectados pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG) e identificados pelo emprego da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Os compostos identificados são sintetizados ou adquiridos comercialmente e testados em bioensaios comportamentais em condições de laboratório, semicampo e de campo (Figura 6) (FERREIRA & ZARBIN, 1998; HOWSE *et al.*, 2013; CORRÊA & SANT'ANA, 2001).

**Figura 6** – Etapas de identificação de semioquímicos



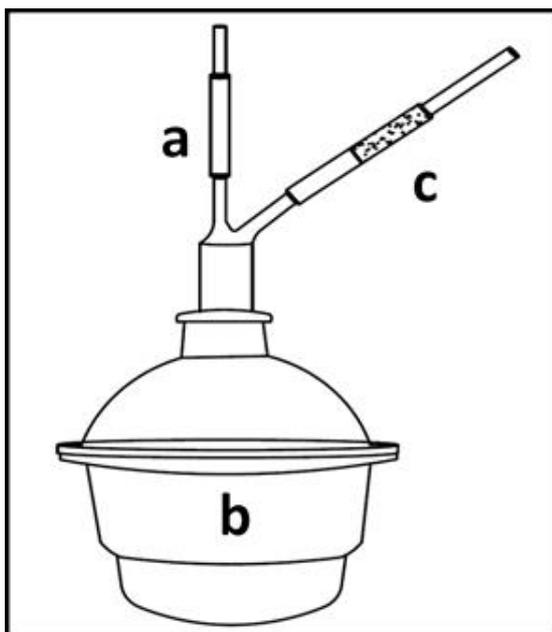
Fonte: Autora, 2017

### 2.10.1. Aeração

A aeração consiste na coleta dos constituintes voláteis liberados por organismos vivos, através da passagem de um fluxo de ar purificado, que arrasta as moléculas destes voláteis presentes na câmara onde os organismos emissores são mantidos, e as conduz até um tubo preenchido com sólidos adsorventes, conhecido como tubo coletor de voláteis, no qual estas moléculas são aprisionadas (Figura 7). Os adsorventes mais comumente utilizados são o carvão ativo, polímeros porosos Porapak® (co-polímero de etilvinilbenzeno–divinilbenzeno) e Tenax® (polímero poroso de óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), porque adsorvem os compostos voláteis ao mesmo tempo, que não adsorvem oxigênio, nitrogênio e principalmente vapor de água, que dependendo das análises posteriores, podem saturar a câmara de injeção, modificar os tempos de retenção, diminuir a vida útil da coluna e interferir nos espectros de massas (COLE, 1980; NOGUEIRA, 2002).

O processo físico de adsorção é baseado em atrações eletrostáticas entre os grupos funcionais da superfície do adsorvente e os das moléculas dos constituintes adsorvidos (HOWSE *et al.*, 2013). Além da câmara e do tubo coletor que está conectado à sua saída, os sistemas de aeração possuem também um filtro tubular de carvão ativo, conectado à entrada desta mesma câmara, para purificação do fluxo de ar que entra. Este fluxo de ar é succionado por uma linha de vácuo adaptada à extremidade do tubo coletor. Findo o tempo estabelecido para a coleta dos compostos voláteis, que é variável para cada espécie estudada, interrompe-se a linha de vácuo e o tubo coletor é desconectado do sistema (ZARBIN, 2001). O formato e volume da câmara para a coleta de voláteis liberados pelos insetos pode variar conforme as características do inseto (tamanho, caracteres biológicos e quantidade necessária de insetos). A dessorção do material adsorvente se dá através da lavagem do mesmo com solvente (ZARBIN, 2001).

**Figura 7** – Extração por aeração



(a)- Carvão ativo, (b)- Câmara para coleta de voláteis e (c)- Adsorvente

Fonte: Autora, 2017

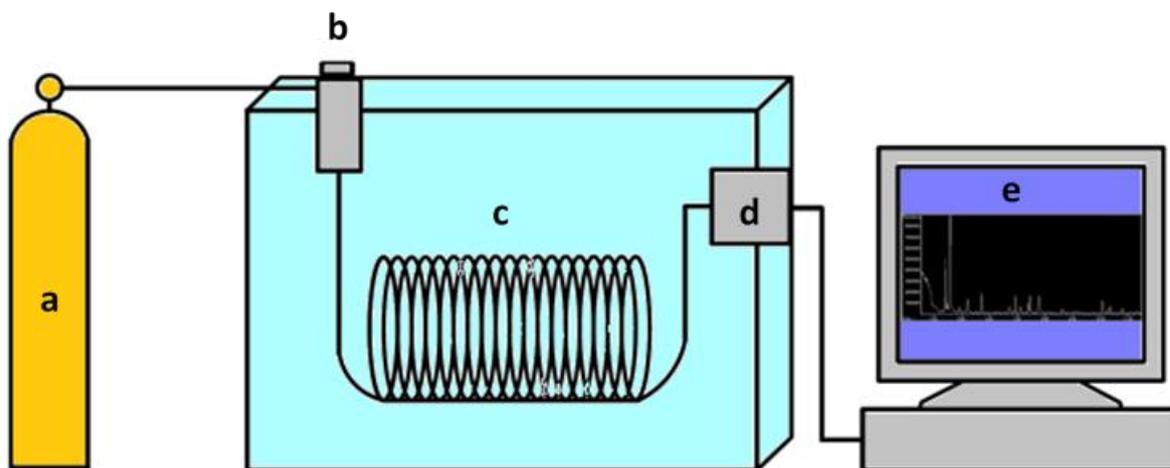
## **2.10.2. Técnicas para Identificação de semioquímicos**

### **2.10.2.1. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)**

O método para a separação de compostos voláteis deve ser simples, rápido, eficiente e de baixo custo, compreendendo uma única etapa que separe os componentes voláteis da matriz da amostra ao mesmo tempo em que os concentra com a menor manipulação possível (COLLINS *et al.*, 2006). A espectrometria de massas é uma técnica de identificação que fornece informação estrutural, massa molar, aumento adicional da seletividade, além de funcionar como um detector extremamente sensível, composto por três partes fundamentais: a fonte de ionização, onde as moléculas do composto da amostra são ionizadas; o analisador, onde ocorre a separação dos íons formados pela razão massa/carga; e o detector, onde os íons são detectados (Figura 8) (SKOOG, *et al.*, 2006). O uso de temperaturas adequadas no local de injeção da amostra e na coluna de separação possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam a saída da coluna em tempos diferenciados (COLLINS *et al.*, 2006). A cromatografia gasosa é uma técnica que tem como vantagens a rapidez, um poder de resolução excelente, alta sensibilidade além de operar com pequenas quantidades de amostra; por estas características essa técnica, é amplamente utilizada para identificação de feromônios

e compostos voláteis liberados por frutos (HEATH *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001; CECCHI, 2003;; LÓPEZ-GUILLEN *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013)

**Figura 8-** Cromatógrafo Gasoso acoplado à espectrometria de massas



(a)-Suprimento de gás de arraste, (b)- Injetor, (c)- Coluna capilar, (d)- Detector e (e) - Cromatograma

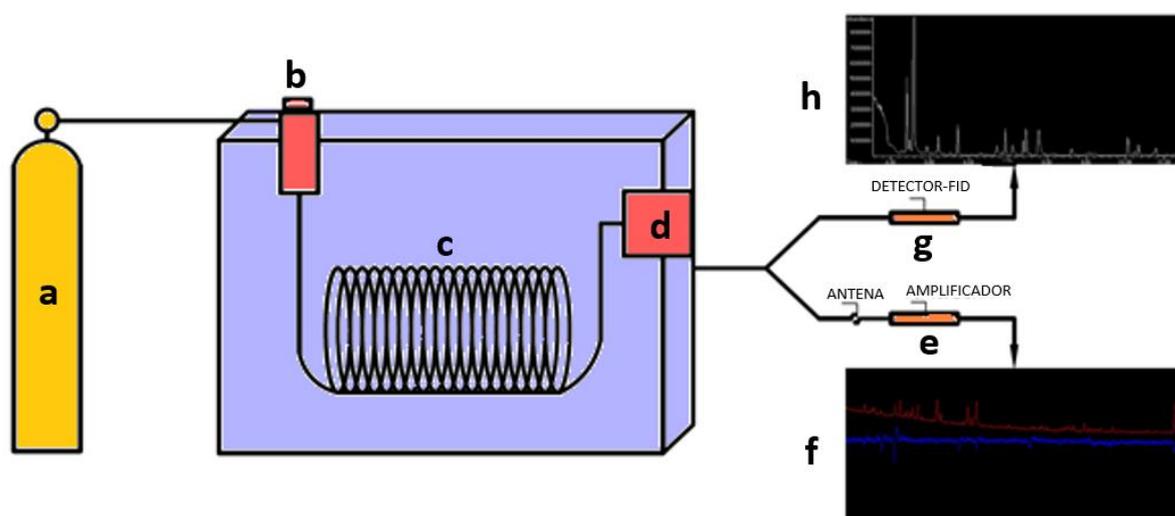
Fonte: Autora, 2017

### 2.10.3. Cromatografia gasosa acoplada a detector eletroantegráfico (CG-EAG)

Em relação à comunicação química, as principais características apresentadas pelos insetos é a sensibilidade e a especificidade com que atuam suas antenas para a percepção de compostos (ZARBIN & FERREIRA, 1998). O estudo do comportamento eletrofisiológico do sistema olfativo do bicho da seda *Bombyx mori*, constatou que utilizando uma antena isolada, posicionada entre dois microeletrodos capilares, conectados a um amplificador e um registrador seria possível registrar o potencial de recepção do inseto ao seu feromônio (ZARBIN *et al.*, 1999; FREITAS, 2009). Este sistema chamado EAD (“eletroantegráfico detector”), utiliza a antena do inseto como elemento sensível (detector biológico) e passou a ser utilizado para a realização de ensaios biológicos (FREITAS, 2009; MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2015). Em 1969 o sistema EAD foi acoplado a um cromatógrafo a gás, possibilitando o surgimento de método extremamente eficaz para a detecção de semioquímicos, visto que associa a enorme capacidade analítica e de separação do cromatógrafo à especificidade e sensibilidade do EAD (ZARBIN *et al.*, 1999). O CG-EAD analisa um extrato bruto e determina, com total exatidão, qual ou quais compostos podem exercer efeito biológico sobre o inseto (FREITAS, 2009).

A figura 9 ilustra o esquema de um cromatógrafo a gás acoplado a um detector eletroantegráfico (CG-EAD), no qual a amostra ao ser injetada, irá percorrer toda a coluna para que haja a separação dos compostos. Ao final da corrida, o fluxo que está saindo da coluna é dividido (split) em dois, sendo que uma parte vai para o DIC (Detector de ionização de Chamas) onde o cromatograma é registrado e a outra parte vai para o EAG, onde a resposta da antena é amplificada. Em função de ambas as detecções serem simultâneas, é possível saber se o composto registrado pelo DIC é ou não ativo (ZARBIN *et al.*; 2001).

**Figura 9** – Cromatografia Gasosa Acoplada a Eletroantegráfia (CG-EAD)



(a)-Suprimento de gás de arraste, (b)- Injetor, (c)- Coluna capilar, (d)- Detector, (e)-Amplificador, (f)- Cromatograma, (g) Detector FID e (h)- Eletroantegráfia.

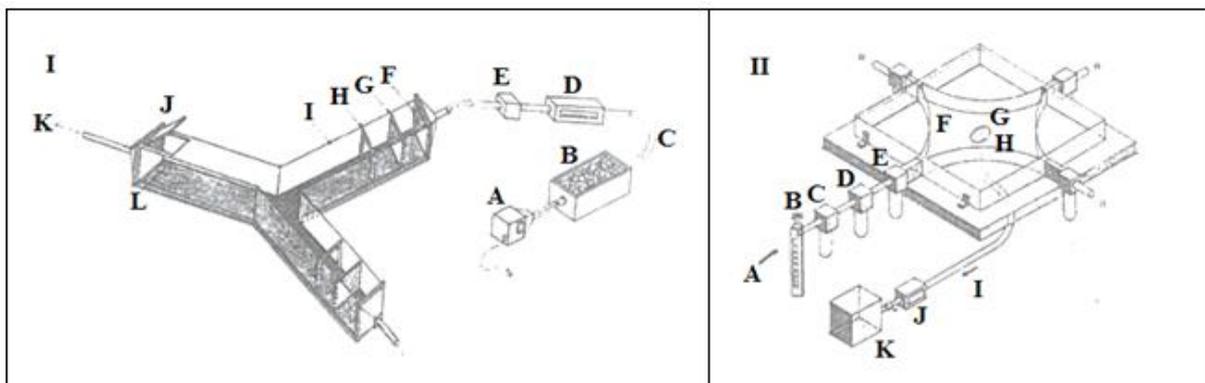
Fonte: Autora, 2017

### 2.10.3. Bioensaios comportamentais

O estudo dos compostos que estão presentes na comunicação química dos insetos, não envolve apenas a extração e identificação, mas também os testes comportamentais que definem a atividade biológica dos compostos. Os testes comportamentais permitem a determinação da completa identidade de um semioquímico e a sua função no mecanismo comportamental do inseto frente aos estímulos (EIRAS *et al.*, 2001). Existe uma grande variedade de aparelhos para o estudo comportamental, entretanto é possível que haja adaptações circunstanciais para determinados insetos, ou se necessário, desenvolver novos aparelhos para análise dos comportamentos (EIRAS *et al.*, 2001).

Em um bioensaio, quantifica-se a resposta pelo número de insetos testados que respondem a um determinado odor e qualifica-se a resposta pelas atividades comportamentais que evidenciam a percepção do estímulo. Os testes utilizados para analisar a resposta comportamental de insetos, podem ser realizados com testes com fluxo de ar (utilizados para insetos que se orientam através da corrente de ar) e testes sem a presença do fluxo de ar (utilizados para insetos que não dependem da corrente de ar para orientação). Para realização dos testes com o fluxo de ar, os bioensaios são feitos principalmente a partir de olfatômetros e túnel-de-vento, para insetos que se locomovem voando, como os lepidópteros, dípteros e himenópteros (parasitoides) e para testes sem fluxo de ar, utiliza-se o olfatômetro que é recomendado, principalmente, para insetos que se locomovem no chão, como os coleópteros e heterópteros (Figura 10) (STEIN & SANT'ANA, 2001; EIRAS *et al.*, 2001).

**Figura 10** – Olfatômetro

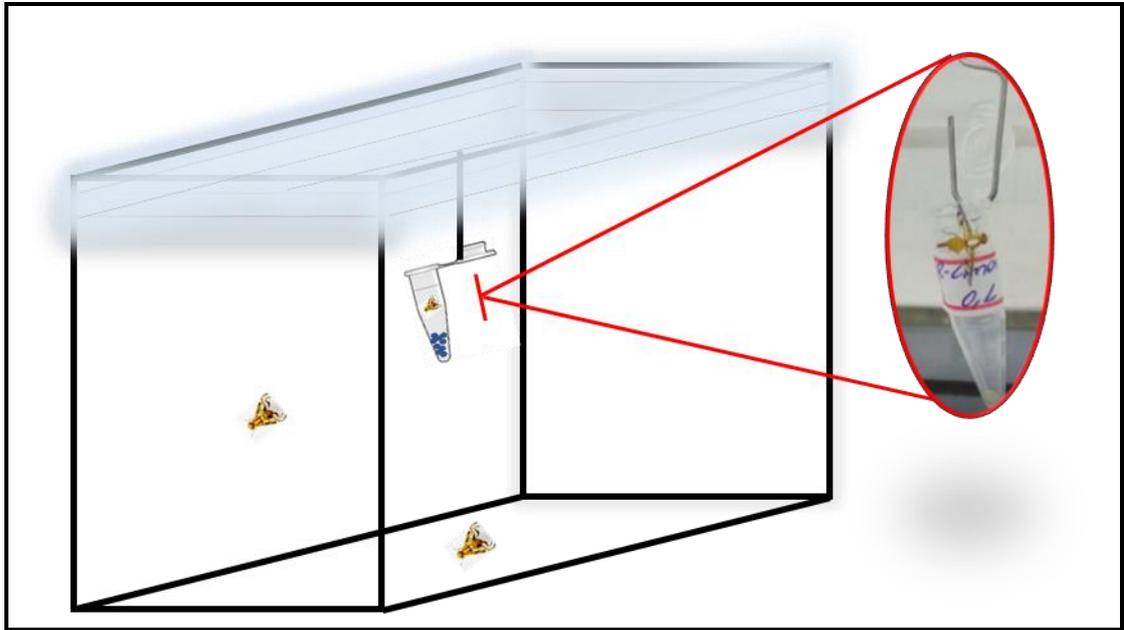


**Fonte:** Adaptado de Stein & Sant'Ana, [2001]. Descrição (I) – A – reostato com ventilador; B – filtro de ar; C – sentido do vento; D – fluxômetro; E – tela difusora; G – filtro; H – ponto final; I – parede lateral e tampa de vidro; J – tampa para liberação do inseto; K – saída de ar (exaustão); L – ponto de liberação. (II) – A – entrada de ar; B – fluxômetro; C – umidificador; D – fonte de estímulo; E – jarro coletor; F – arena; G – local de liberação do inseto; H – saída do ar da arena; I – fluxo de ar; J – fluxômetro geral; K – compressor de ar.

Nos testes comportamentais de algumas espécies de moscas-das-frutas, são utilizadas arenas de vidro que podem ter tamanhos diferentes dependendo da análise comportamental que será observada (MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015). A arena de vidro (Figura 11) permite o uso de mais de um inseto por repetição, o que pode aumentar a comportamento do inseto visto que machos ou fêmeas coespecíficos estão no mesmo ambiente. Nestes bioensaios, alguns parâmetros como tempo de observação, concentração e volume das soluções dos compostos testados assim como o substrato de liberação devem ser definidos para garantir uma resposta confiável e natural do inseto. O mecanismo de funcionamento dos equipamentos para bioensaios é semelhante e consiste basicamente em: um organismo teste, uma fonte de

estímulo, uma arena para liberação desse organismo (que será definida de acordo com a espécie estudada) e um fluxo de ar com velocidade controlada.

**Figura 11** – Bioensaio em arena de vidro



**Fonte:** Autora, 2017

## 2.12 Referências

- AGUIAR-MENEZES, E.L.; FERRARA, F.A.A.; MENEZES, E.B. Mosca-das-frutas. In: CASSINO, P.C.R.; RODRIGUES, W.C. (Coord). **Citricultura fluminense: principais pragas e seus inimigos naturais**. Rio de Janeiro: Seropédica, 2004
- ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 155-178, 1994.
- ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends Biotechnology**., Amsterdam , v. 17, p. 409-421, 1999.
- ARAUJO, E. L., CUNHA, A. A., SILVA, R. K. B., NUNES, A. M. M., & GUIMARÃES, J. A. Espécies de moscas das frutas (Diptera, Tephritidae) na região do Baixo Jaguaribe, Estado do Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 577-581, 2009.
- ARIOLI, C. J., BOTTON, M., MAFRA-NETO, A., MOLINARI, F., BORGES, R., & PASTORI, P. L. ARIOLI. Feromônios sexuais no manejo de insetos-praga na fruticultura de clima temperado. **Technical Bulletin**, Epagri, Florianópolis, v. 159, 2013.
- AYASSE, M.; PAXTON, R. J.; TENGÖ, J. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. **Annual review of entomology**, v. 46, n. 1, p. 31-78, 2001.
- BAKER, Thomas C. Use of pheromones in IPM. **Integrated pest management**, p. 273-285, 2009.
- BATTISTE, MERLE A. *et al.* Anastrephin and epianastrephin, novel lactone components isolated from the sex pheromone blend of male Caribbean and Mexican fruit flies. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 26, p. 2611-2614, 1983.
- BOLSSET, W.; WILSON, E. The Analysis of Olfactory Communication Among Animals. **Journal of Theoretical Biology**, London, v.5, p. 443-469, 1963.
- BORDEN, J. H. Behavioral responses of Coleoptera to pheromones, allomones, and kairomones. **Chemical Control of Insect Behaviour, Theory and Application**, p. 169-198, 1977.
- BORDEN, J. H. Semiochemical-mediated aggregation and dispersion in the Coleoptera. In: **Symposia of the Royal Entomological Society of London**. 1984.
- BORDEN, J. H. Strategies and tactics for the use of semiochemicals against forest insect pests in North America. **Pest Management: Biologically Based Technologies**. **American Chemical Society**, Washington, DC, p. 265-279, 1993.
- BRAGA-SOBRINHO, R.; MALAVASI, A.; MESQUITA, A. L. M.; OMETO, A. C. F. Manual operacional para levantamento, detecção, monitoramento e controle de moscas-das-frutas. Fortaleza - CE: **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 29, 2001.

CARVALHO, C. *et al.* **Anuário brasileiro da fruticultura 2017**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2017.

CARVALHO, R. S. Metodologia para monitoramento populacional de moscas- de-frutas em pomares comerciais. **Cruz das Almas (BA): Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 17 p, 2005.

CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas das frutas de importância econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p.113-117, 2000.

CECCHI, H.M. Cromatografia Gasosa. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2<sup>a</sup> ed., Campinas-SP. Editora Unicamp, p.201, 2003.

COLE, R. A. The use of porous polymer for the collection of plant volatile. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 31, p. 1242-1249, 1980.

COLLINS, H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. 1 ed. Campinas-SP. **Editora Unicamp**, p. 17-42, 2006.

CORRÊA A.G. e SANT'ANA J. Fundamentos da Comunicação Química de Insetos. In: FERREIRA J.T.B., CORRÊA A.G., VIEIRA P.C. eds. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. São Carlos: EdUFSCAR. p. 9-22. 2001

COSTA, PIETRA LEMOS L. **Aspectos biológicos, morfológicos e genéticos de diferentes populações de *Lutzomyia migonei* (França, 1920) do Brasil**. 2016. Tese de Doutorado. Instituto Aggeu Magalhães, Recife ,2016.

CropLife Latin America. Disponível em: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/moscas-de-la-fruta-y-del-boton-floral>. Acessado em 2 de novembro de 2017.

CRUZ-LÓPEZ, LEOPOLDO *et al.* A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 2, p. 351-365, 2006.

CRUZ-LÓPEZ, Leopoldo; MALO, Edi A.; ROJAS, Julio C. Sex pheromone of *Anastrepha striata*. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 5, p. 458-464, 2015.

CUNHA, M. D., COUTINHO, C. D. C., JUNQUEIRA, N. T. V., & FERREIRA, F. R. **Manga para exportação: aspectos fitossanitários**. EMBRAPA-SPI, 1993.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Cost and benefits of chemical information conveyance: proximate and ultimate factors. In: ROITBERG, B. D.; ISMAN, M. B. (Ed.). **Insect Chemical Ecology: an evolutionary approach**. New York: Chapman & Hall, p. 122-155, 1992.

EIRAS, A. E. *et al.* Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2a ed. **Ribeirão Preto, Holos Editora**, p. 27-39, 2001.

ETGES, WILLIAM J.; VEENSTRA, CHRISTI L.; JACKSON, LARRY L. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VII.

Effects of larval dietary fatty acids on adult epicuticular hydrocarbons. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 12, p. 2629-2646, 2006.

FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. **Poda das plantas frutíferas**. In: FACHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: fundamentos e práticas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.8-13, 2008.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Fao statistical yearbook**. Roma, 307p. 2013.

FERRARA, F.A.A. *et al.* Novos registros de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no estado do Rio de Janeiro. **Neotropical Entomology**, v.33, n.6, p.797-798, 2004.

FREITAS, JOHNNATAN DUARTE DE. **Síntese de Feromônios de Curculionídeos de Interesse Econômico**. 2009. 214 p. Tese (Pós-Graduação) – Instituto de Química e Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Maceió, 2009.

GONÇALVES, GLÁUCIA B. *et al.* Pheromone communication in *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae): A comparison of the volatiles and salivary gland extracts of two wild populations. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1365-1374, 2013.

GOULART, H. F., LIMA, M. R. F., DE MORAIS, R. K., & BERNARDO, V. B. (2015). Feromônios: uma alternativa verde para o manejo integrado de pragas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1205-1224, 2015.

GREGÓRIO, PATRÍCIA LUCIANE FERNANDES; SANT'ANA, JOSUE; REDAELLI, LUIZA RODRIGUES. Percepção química e visual de *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) em laboratório. **Iheringia: série zoologia**. Vol. 100, n. 2, p. 128-132, 2010.

HASSANALI, A.; *et al.* Integrated pest management: the push–pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1491, p. 611-621, 2008.

HEATH, R. R. *et al.* Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. In: **Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior**. CRC-Press, Boca Raton, FL, USA, p. 793-809, 2000.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. *et al.* Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, n. 6, p. 487-499, 2004.

HOWSE, PHILIP; STEVENS, J. M.; JONES, OWEN T. Insect pheromones and their use in pest management. **Springer Science & Business Media**, 2013.

JOHANSSON, B. G.; JONES, T. M. The role of chemical communication in mate choice. **Biological Reviews, Cambridge**, v. 82, n. 2, p. 265-281, 2007.

- JONES, OWEN. Pheromones and other semiochemicals: Essential tools for IPM. **International Pest Control**, v. 56, n. 2, p. 88, 2014
- LANDOLT, PETER J. Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. **American Entomologist**, v. 43, n. 1, p. 12-22, 1997.
- LARSSON, MATTIAS C. Pheromones and other semiochemicals for monitoring rare and endangered species. **Journal of chemical ecology**, v. 42, n. 9, p. 853-868, 2016.
- LEAL, M. R., DA SILVA SOUZA, S. A., DE LIMA AGUIAR-MENEZES, E., LIMA FILHO, M., & MENEZES, E. B. Diversidade de moscas-das-frutas, suas plantas hospedeiras e seus parasitóides nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 627-634, 2009.
- LIMA, IVANILDO S.; HOUSE, PHILIP E.; NASCIMENTO, RUTH R. DO. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): identification and behavioural activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 196-201, 2001.
- LÓPEZ-GUILLÉN, G., LÓPEZ, L. C., MALO, E. A., & ROJAS, J. C. Olfactory responses of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) to volatiles emitted by calling males. **Florida Entomologist**, v. 94, n. 4, p. 874-881, 2011.
- LÓPEZ-LEY, J. U., TOLEDO, J., MALO, E. A., GOMEZ, J., SANTIESTEBAN, A., & ROJAS, J. C. Carambola cultivar, fruit ripeness, and damage by conspecific larvae influence the host-related behaviors of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 109, n. 1, p. 154-160, 2015.
- MACNEIL, J. N.; MILLAR, J. G. Chemical communication: pheromone and allelochemical. In: CHAPMAN, R. F. **The insects structure and function**. 5. ed. New York: Cambridge University Press, p. 857-897, 2012.
- MALAVASI, A. Biologia, ciclo de vida, relação com o hospedeiro, espécies importantes e biogeografia de tefritídeos In: MALAVASI, A.; VIRGINIO, J. (Org.). **Biologia, monitoramento e controle: V Curso Internacional de Capacitação em Moscas-das-Frutas**. Juazeiro, Bahia, p. 1-5, 2009.
- MALAVASI, A., A. S. NASCIMENTO, AND J. M. M. WALDER. **Implementation of a medfly, fruit fly parasitoids and codling moth rearing facility in northeastern Brazil**. No. *IAEA-CN--131*. 2005.
- MALAVASI, ALDO; ZUCCHI, ROBERTO ANTONIO; SUGAYAMA, R. L. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Holos Editora, 2000.
- MALO, E. A., GALLEGOS-TORRES, I., TOLEDO, J., VALLE-MORA, J., & ROJAS, J. C. Attraction of the West Indian fruit fly to mango fruit volatiles. **Entomologia experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 45-52, 2012.

MARQUES, A.S.S. **Monitoramento de moscas das frutas em pomar de laranjeira em Altamira-Pará.** Tese (Doutorado em Agronomia). Adrielli do Socorro Silva Marques- Pará. Marques, A.S.S 2010.

MILET-PINHEIRO P, NAVARRO DM, DE AQUINO NC, FERREIRA LL, TAVARES RF, DA SILVA RCC, LIMA-MENDONÇA A, VANÍČKOVÁ L, MENDONÇA AL, DO NASCIMENTO RR (2015) Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Chemoecology**, v. 25, n. 3, p. 115-122, 2015.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lista de pragas quarentenárias ausentes e presentes. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-quarentena/lista-de-pragas-quarentenarias-ausentes-e-presentes.pdf/view>>. Acesso em: 2 de novembro de 2018.

MORAES, M., LAUMANN, R., PAULA, D., PAREJA, M., SILVA, C., Vieira, H. G. Eletroantografia: a antena do inseto como um biossensor. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

MUÑOZ-PALLARES, J., CORMA, A., PRIM, J., PRIMO-YUFERA, E. Zeolites as pheromone dispensers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4801-4801, 2001.

NARANJO, S. E.; ELLSWORTH, P. C.; FRISVOLD, G. B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 621-645, 2015.

NATION, JAMES L. Biology of pheromone release by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). **Journal of chemical ecology**, v. 16, n. 2, p. 553-572, 1990.

NATION, JAMES L. Sex pheromone of the Caribbean fruit fly: chemistry and field ecology. In: **Natural Products**, v. 2, p. 109-110, 1983.

NOGUEIRA, P. C. L. **Contribuição à química dos compostos voláteis e interações com os organismos receptores.** 2002, 211f. Tese (Doutorado em química) Universidade de Campinas, Campinas-SP. 2002.

NONDILLO, A. *et al.* Efeito de Inseticidas Neonicotinóides sobre a Mosca-das-Frutas Sul-Americana, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na Cultura da Videira. **BioAssay**, v.2, p.1-9. 2007.

NORDLUND, DONALD A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 2, p. 211-220, 1976.

NORRIBON, A.L. & KIM, K.C. A list of the reported host plant of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **U.S. Dept. Agric., APHIS (PPQ)** 81-52. 114p. 1988.

PICANÇO, M. C., DE PAULA, S. V., JUNIOR, A. R. M., DE OLIVEIRA, I. R., SEMEÃO, A. A., & ROSADO, J. F. Impactos financeiros da adoção de manejo integrado de pragas na cultura do tomateiro. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 26, n. 2, p. 245-252, 2008.

PINHEIRO, F. A., DE BARROS, A. V., & PINHEIRO, S. Processos de certificação para exportação de frutas frescas brasileiras. In: **XXIX encontro nacional de engenharia de produção**. Bahia, 2009.

RAGA, A., M.F. SOUZA FILHO, V. ARTHUR, M.E. SATO, L.A. MACHADO AND A. BATISTA FILHO. **Observações sobre a incidência de moscas-das-frutas em frutos de laranja (*Citrus sinensis*)**. Arq. Inst. Biol., v. 64, n.2, p.125-129. 1997.

REYES, H., MALO, E. A., TOLEDO, J., CRUZ-ESTEBAN, S., & ROJAS, J. C. Physiological state influences the antennal response of *Anastrepha obliqua* to male and host volatiles. **Physiological Entomology**, v. 42, n. 1, p. 17-25, 2017.

RIFFEL, A.; DA COSTA, J. G. Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (**INFOTECA-E**). 2015.

ROCCA, JAMES R. *et al.* Comparison of volatiles emitted by male Caribbean and Mexican fruit flies. **Journal of chemical ecology**, v. 18, n. 2, p. 223-244, 1992.

RONCHI-TELES, BEATRIZ. **Ocorrência e Flutuação populacional de espécies de moscas-das-frutas e parasitóides, com ênfase para o gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), na Amazônia brasileira, Manaus**. Tese (Doutorado) - INPA/UA. 2000.

RORIZ, A. K. P., CRUZ, M. A., BRAVO, I., SELIVON, D., & DO NASCIMENTO, A. S. Controle para o estabelecimento de colônias de *Anastrepha Obliqua* e *A. fraterculus* (Diptera: Tephritidae) com base em características morfológicas externas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2015.

SALDANHA, L.A., & SILVA, N.M. Semi-artificial rearing of the larvae of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in Manaus, Amazon-Brazil. **Florida Entomol.** 82: 82-90. 1999.

SELIVON, D. Relações com as plantas hospedeiras. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Holos, 327p, p. 87-91, 2000.

SILVA, ALEXANDRE CÂNDIDO DA. **Potencial de nematóides entomopatogênicos para o controle da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann)(Diptera: Tephritidae) e do gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* (Marshall)(Coleoptera: Curculionidae)**. Tese de doutorado- São Paulo. 2009.

SKOOG- WEST- HOLLER- CROUCH- **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana. Editora Thompson, p.858-921. 2006.

SOBRINHO, R. B., MALAVASI, A., MESQUITA, A. L. M., & OMETO, A. C. F. **Manual operacional para levantamento, detecção, monitoramento e controle de moscas-das-frutas**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

SOUZA-FILHO, M. F. Moscas das frutas. In: **Anais da 7ª Reunião itinerante de fitossanidade do instituto biológico**. Indaiatuba-SP, p.23-36 , 2002.

STEIN, K.; SANT'ANA, J. **Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos**. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (Ed.). **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: EdUFSCAR. p. 47-74, 2001.

THOMAZINI, Marcílio José. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. **Embrapa Florestas-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.

TILLMAN, J. A., SEYBOLD, S. J., JURENKA, R. A., & BLOMQUIST, G. J. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 481-514, 1999.

TOLEDO, J., MALO, E. A., CRUZ-LÓPEZ, L., & ROJAS, J. C. Field evaluation of potential fruit-derived lures for *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 6, p. 2072-2077, 2009.

TREICHEL, M. *et al.* **Anuário Brasileiro de Fruticultura 2016**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, 2016.

VANÍČKOVÁ, LUCIE *et al.* Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of the medfly sex pheromone. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7168-7176, 2012b.

VANÍČKOVÁ, LUCIE. **Chemical ecology of fruit flies genera *Ceratitis* and *Anastrepha***. Tese, Institute of Chemical Technology, Prague, 2012.

WEENS JR. *et al.* West Indian fruit fly, *Anastrepha obliqua* (Macquart). **Universidade da Florida**, n. 198. 8p. 2001.

WYATT, TRISTRAM D. Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures. **Cambridge University Press**, 2014.

ZALETA, DORA ALICIA ORTEGA; MÍRELES, HÉCTOR CABRERA. Productos naturales y comerciales para la captura de *Anastrepha obliqua* M. EN trampas mcphail en Veracruz. **Agricultura técnica en Mexico**, v. 22, p. 63, 1996.

ZARBIN, P. H. G ; FERREIRA, J. T. B. Amor ao primeiro odor: A comunicação química entre os insetos. **Química Nova na Escola**, v.2, n.7, p.3 - 6, 1998

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. **Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo** de Pragas, 2nd ed. Holos, Ribeirão Preto, Brasil, p. 45-50, 2001.

ZARBIN, PAULO HENRIQUE GORGATTI; FERREIRA, J. TÉRCIO B.; LEAL, W. S., **Metodologias Gerais Empregadas no Isolamento e Identificação Estrutural de Feromônio de Insetos**, Química Nova, v. 22, n° 2, p. 263–26, 1999.

ZARBIN, Paulo HG; RODRIGUES, Mauro ACM; LIMA, Eraldo R. Feromônios de insetos&58; tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil Insect pheromones&58; technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, p. 13-24, 2000.

ZUCCHI, R.A. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. In: ORTIZ-HERNANDÉZ, V. (Ed.). **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera:Tephritidae): diversidad, biología y manejo**. Distrito Federal, México: S y G Editores, p.77-100, 2007.

ZUCCHI, R.A. 2012. **Fruit flies in Brazil** - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly. Disponível em:< [www.lea.esalq.usp.br/ceratitis](http://www.lea.esalq.usp.br/ceratitis)>. Acesso em 23 de janeiro de 2018.

### **3. CAPÍTULO I - Identificação do feromônio sexual de *Anastrepha obliqua***

## Identificação do feromônio sexual de *Anastrepha obliqua*

NATHALY C. DE AQUINO<sup>1</sup>; LUANA L. FERREIRA<sup>1</sup>; RAPHAEL DE F. TAVARES<sup>2</sup>; CLAUDINETE S. SILVA<sup>3</sup>; ADRIANA DE L. MENDONÇA<sup>4</sup>; IARA SORDI JOACHIM-BRAVO<sup>5</sup>; PAULO MILET-PINHEIRO<sup>6</sup>; DANIELA M. DO A. F. NAVARRO<sup>7</sup>; RUTH R. DO NASCIMENTO<sup>8</sup>

1. Doutoranda - Renorbio.
2. Doutorando em Química e Biotecnologia - PPGQB-UFAL
3. Mestre em Química e Biotecnologia - PPGQB-UFAL
4. Prof<sup>a</sup> Dra. - Centro Universitário Tiradentes-UNIT
5. Prof<sup>a</sup> Dra. Instituto de Biologia-UFBA
6. Pesquisador (PNPD) - Departamento de Botânica da UFPE
7. Prof<sup>a</sup> Dra. - Departamento de Química Fundamental da UFPE
8. Prof<sup>a</sup> Dra. Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL

### RESUMO

A mosca das frutas, *Anastrepha obliqua*, é considerada uma praga de restrição quarentenária com alta capacidade de adaptação e polifagia. Com o objetivo de desenvolver formulações atraentes para fêmeas desta espécie, o presente estudo identificou quais compostos da mistura feromonal dos machos de *A. obliqua* estimulam as antenas das fêmeas e avaliou a atratividade destes compostos a partir de experimentos comportamentais. Para isso, amostras dos compostos orgânicos voláteis (COVs) dos machos foram coletadas a partir da técnica de Headspace dinâmico e utilizadas nas análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG). As amostras foram então analisadas em um GC-MS para a identificação dos compostos que estimularam a antena das fêmeas. As formulações obtidas com compostos individuais, em diferentes combinações e concentrações, foram testadas sob condições de laboratório e seminaturais, através de bioensaios comportamentais com fêmeas de *A. obliqua*. Os resultados demonstraram que cinco compostos desencadearam despolarização na antena das fêmeas, a saber, 1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno. Quando testados em combinação, as formulações demonstraram que fêmeas de *A. obliqua* foram atraídas para todas as misturas testadas onde foram observadas respostas semelhantes àquela exibida para o extrato de aeração de machos virgens. Os resultados mostram que as formulações com os compostos eletrofisiologicamente ativos apresentam grande potencial para uso no monitoramento e controle das populações de *A. obliqua*.

**Palavras-chave:** Moscas das frutas; feromônio sexual; CG-EAD; atraentes para fêmeas;

## INTRODUÇÃO

O uso de feromônios na comunicação entre insetos é fundamental por desencadear reações comportamentais ou fisiológicas específicas em um ou mais indivíduos da mesma espécie, este processo é complexo e exige uma excelente habilidade do organismo receptor para processar e responder aos sinais olfativos (TILLMAN *et al.*, 1999; DIAZ-SANTIZ, 2016). As informações transmitidas por esses compostos vêm sendo elucidadas, através de estudos da quimiorrecepção, com moscas das frutas da família Tephritidae (HALLBERG *et al.*, 1984; MAYO *et al.*, 1987; DICKENS, 1989; BIGIANI *et al.*, 1989; ARZUFFI *et al.*, 2008; CASTREJÓN-GÓMEZ, 2006; ROJAS *et al.*, 2009). Dentre as espécies estudadas, a mosca do Oeste Indiano, *Anastrepha obliqua* (Macquart), destaca-se devido a sua polifagia. Em nível mundial, *A. obliqua* apresenta uma ampla distribuição nos países das Américas com destaque para Colômbia e México; no Brasil, esta espécie é caracterizada como uma praga de restrição quarentenária associada a 49 espécies hospedeiras (CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; ZUCCHI, 2012).

A comunicação química através do feromônio sexual, para moscas das frutas, requer que os compostos sejam voláteis e, por este motivo ocorre a evaporação passiva do feromônio a partir de uma glândula de superfície exposta, que no caso da espécie de *A. obliqua*, é liberado pelos machos para atração de machos homoespecíficos e de fêmeas (BOSSERT & WILSON, 1963; JOHANSSON & JONES, 2007). O feromônio sexual de 5 espécies do gênero *Anastrepha* já foram caracterizados, sendo elas: *A. suspensa*, *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* e *A. fraterculus* (NATION 1983, 1990; BATTISTE *et al.*, 1983; ROCCA *et al.*, 1992; HEATH *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2001; LÓPEZ-GUILLEN *et al.*, 2011; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2015). No que se refere a espécie *A. obliqua*, um estudo conduzido por López-Guillén *et al.* (2011) identificou nove compostos presentes na mistura de voláteis liberada por machos de uma população mexicana assim como, a atratividade de machos e fêmeas para alguns dos compostos identificados. Posteriormente, Gonçalves *et al.* (2013) identificou os compostos orgânicos voláteis liberados por machos de 2 populações brasileiras além dos constituintes químicos presentes nos extratos das glândulas salivares (LÓPEZ-GUILLEN *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013).

Atualmente, pesquisas que contemplem o estudo da comunicação química entre moscas das frutas e que visem a obtenção de formulações atraentes, eficazes e viáveis são de grande relevância para a obtenção de produtos que possam ser empregados no controle desta

praga. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), mundialmente, os prejuízos causados por tefritídeos totalizaram US\$ 1,7 bilhão por ano, sendo que 10% desses prejuízos ocorrem no Brasil (FAO 2010). Diante do exposto, o presente estudo objetivou identificar os compostos que são eletrofisiologicamente ativos na mistura feromonal de machos de *A. obliqua* utilizando as técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica (CG-DEA) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e avaliar a atratividade de fêmeas virgens para os compostos EAD-ativos formulados em misturas, através de bioensaios comportamentais em condições de laboratório.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Criação de Insetos**

Foram realizadas coletas de frutos de goiaba e carambola, infestados com larvas da mosca das frutas *A. obliqua*, no estado de Alagoas (AL) em pomares domésticos da região (9°36'02.9"S, 35°46'13.2"W - Santa Amélia). Em seguida, os frutos foram acondicionados em gaiolas de isopor (45L) com abertura na parte superior, coberta com tecido tipo *voil* para facilitar a aeração dos frutos e dentro da gaiola foi adicionado cerca de 3 cm de vermiculita com grânulo médio como substrato para pupação das larvas. As gaiolas com frutos infestados foram mantidas em condições semi ambientais (25°C e umidade relativa de 55%) e a identificação das espécies foi baseada nas características morfológicas do acúleo das fêmeas (Zucchi, 2000).

Os insetos adultos, provenientes dos frutos infestados, foram sexados e mantidos em gaiolas (20 cm x 30 cm x 15 cm) contendo dieta artificial (açúcar cristal, extrato de soja, levedo de cerveja e gérmen de trigo) na proporção 3:3:1:1, água servida em recipiente de plástico contendo esponja levemente umedecida e frutos de goiaba que serviram como substrato de oviposição para as fêmeas. No que tange aos frutos sadios, estes foram submetidos a um tratamento térmico (60°) para tornar inviável ovos de moscas das frutas que, porventura, tenham sido depositados previamente na superfície do fruto. A manutenção da população domesticada foi realizada duas vezes por semana com troca da dieta e do substrato de oviposição e introdução de novos insetos adultos provenientes das coletas de campo para garantir que a população domesticada mantivesse suas características selvagens. A temperatura do insetário foi mantida em 25°C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 14 horas.

### **Coleta de feromônio sexual**

A obtenção do extrato do feromônio de machos da população domesticada de *A. obliqua* foi realizada pelo emprego da técnica de aeração conhecida também como “*headspace* dinâmico ” que consiste em um fluxo de ar que purga as substâncias voláteis, emitidas pelos insetos, para um polímero adsorvente, neste caso 150 mg de Tenax<sup>®</sup> com diâmetro poroso de 60-80 mesh. Para produzir o fluxo de ar, foi utilizada uma bomba de ar conectada a um fluxômetro (0,5 L/min). O ar de purga passava por um tubo contendo filtro de carvão ativado e era introduzido em um dessecador de vidro modificado com 20 cm de diâmetro e 18 cm de altura, contendo 50 machos com idade entre 10-20 dias. Os compostos voláteis liberados pelos machos ficaram retidos no material adsorvente o qual, a cada período de 24 h, era substituído por um novo tubo contendo adsorvente. Esse procedimento foi realizado durante sete dias, perfazendo um total de sete amostras. Os COVs dos machos adsorvidos nos polímeros foram eluído com 2 mL de hexano bidestilado (grau HPLC). A cada eluição realizada, 1 mL do extrato obtido foi transferido para ampolas de vidro, que foram seladas hermeticamente e acondicionadas em freezer a temperatura de -5 °C para posteriores análises por CG-DEA e CG-EM e/ou utilização nos experimentos comportamentais. Uma alíquota das amostras (1,0 µL) foi injetada em cromatógrafo gasoso HP 5890 sob o modo *splitless*. As fêmeas virgens de *A. obliqua* com idade variando entre 10-20 dias (N=6) foram utilizadas para as análises. A cabeça de cada fêmea foi excisada do tórax usando microtesoura. A base da cabeça e a ponta de uma das antenas foram então montadas entre dois eletrodos capilares de vidro, preenchidos com solução de Ringer (8.0 g/L de NaCl, 0,4 g/L de KCl, 0,4 g/L de CaCl<sub>2</sub>) e ligado a fios de prata. Durante o processo, o fluxo de gás de arraste, contendo os constituintes químicos separados na coluna, foi dividido em duas partes iguais: uma seguiu para a antena do inseto (detector antenográfico) e a outra para o FID, ocorrendo o registro simultâneo das respostas de ambos os detectores ao material eluído da coluna. Um composto foi considerado EAD-ativo quando induziu despolarização na antena em, pelo menos, três dos seis indivíduos testados.

### **Identificação das estruturas dos compostos eletrofisiologicamente ativos por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas**

As análises dos extratos de machos coespecíficos em chamamento foram realizadas com objetivo de identificar os compostos que geraram despolarização na antena. Para tanto, alíquotas de 1 µL das amostras hexânicas do feromônio foram injetadas em modo *splitless* em

um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS; Agilent 7890ATM gás chromatograph, Agilent 5975C Series MSDTM mass spectrometer, Palo Alto, USA). O forno do cromatógrafo foi equipado com uma coluna apolar HP-5 (Agilent J&W; 30 m × 0.25mm d.i. 0.25µm espessura do filme) e mantido inicialmente a 40 °C por 2 min, com aumento gradativo da temperatura em 4 °C min<sup>-1</sup>, até atingir a temperatura final de 230 °C, que foi mantida por 4 min. O fluxo de hélio foi preservado em pressão constante de 7.0 psi. A interface do EM e do quadrupolo foram ajustadas em 230 °C e 150 °C, respectivamente. Os espectros de massas foram registrados em 70eV (em modo EI) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan<sup>-s</sup> de *m/z* 30-350.

A identificação dos compostos eletrofisiologicamente ativos foi realizada por comparação de seus espectros de massas e tempos de retenção com o de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência NIST08, Adams (2007) e Wiley Registry<sup>TM</sup> (versão 9), integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies, Palo Alto, EUA. As atribuições de estrutura de componentes individuais foram confirmadas a partir da comparação dos espectros de massas e dos tempos de retenção de padrões disponíveis comercialmente. As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores foram utilizados para determinar as proporções relativas de cada composto presente nos extratos de machos coespecíficos.

### **Obtenção das soluções e formulações dos compostos sintéticos**

Os padrões dos compostos sintéticos (1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno) foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (Brasil) apresentando grau de pureza  $\geq 98,5\%$ . Posteriormente, para o preparo das soluções dos compostos que geraram despolarização na antena das fêmeas, foram utilizados os procedimentos descritos a seguir: 10 µL do composto sintético foram transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL completando-se o volume com hexano bidestilado grau (HPLC) e homogeneizando a solução, obtendo-se assim, uma solução com concentração 1,0 µL/mL. Esta concentração foi diluída em 100 vezes para obtenção da solução de concentração de 0,01 µL/mL que foi utilizada em todos os testes comportamentais, a definição desta concentração tem como base bioensaios comportamentais realizados anteriormente com a mesma espécie. As soluções dos compostos foram acondicionadas em *vials* de vidro, os quais foram mantidos em freezer para posterior emprego nos bioensaios comportamentais. Volumes de 10 µL de cada solução dos compostos individuais/mistura na concentração de 0,01 µL/mL foram formulados em

*ependorfs* separados contendo 10 mg de um substrato biopolimérico, através da adsorção por contato em uma sala com temperatura controlada (25 °C) durante um período de 24h, garantindo a evaporação do solvente utilizado no preparo das soluções. As formulações obtidas resultaram na dose 0,1 ng.

### **Ensaio de laboratório com as formulações**

Testes de dupla escolha foram conduzidos durante a fotofase, em sala com fotoperíodo controlado (14L:10D), no horário entre as 14:00-16:00 h, em arenas de vidro (45 cm largura x 30 cm altura x 30 cm profundidade) cobertas com tecido *voil*. Para tanto, foram testadas as misturas formuladas: **MA** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno), **MB** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol), **MC** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e  $\alpha$ -farneseno), **MD** (1-heptanol, linalol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno), **ME** (1-heptanol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno) e **MF** ( linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno). frente ao extrato do feromônio (controle positivo) na proporção encontrada nos extratos de machos 95:0,7:1,5:1,5:1,5 respectivamente. O controle negativo (*ependorf* com substrato) também foi avaliado em bioensaios de dupla escolha apenas frente ao controle positivo (extrato do feromônio de machos virgens).

As formulações foram penduradas equidistantemente (30 cm) em extremidades opostas da arena. Nestes testes foram utilizados grupos de seis fêmeas virgens de *A. obliqua*, marcadas com tinta atóxica com idades variando de 10-20 dias, as quais foram introduzidas na arena e o seu comportamento, bem como o tempo necessário para chegar à fonte de liberação do odor, foram registrados durante 20 min. Os comportamentos registrados foram de pouso e permanência na fonte de odor, os quais foram caracterizados como comportamento de atração. Foram realizadas quatro repetições por tratamento nas quais seis fêmeas foram utilizadas uma única vez durante os experimentos, considerando cada fêmea marcada como uma repetição (N=24).

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos nos testes de laboratório foram analisados primeiramente com a finalidade de verificar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos pelos testes de Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ). Uma vez atendidos, o teste de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ) foi aplicado para verificação de diferenças

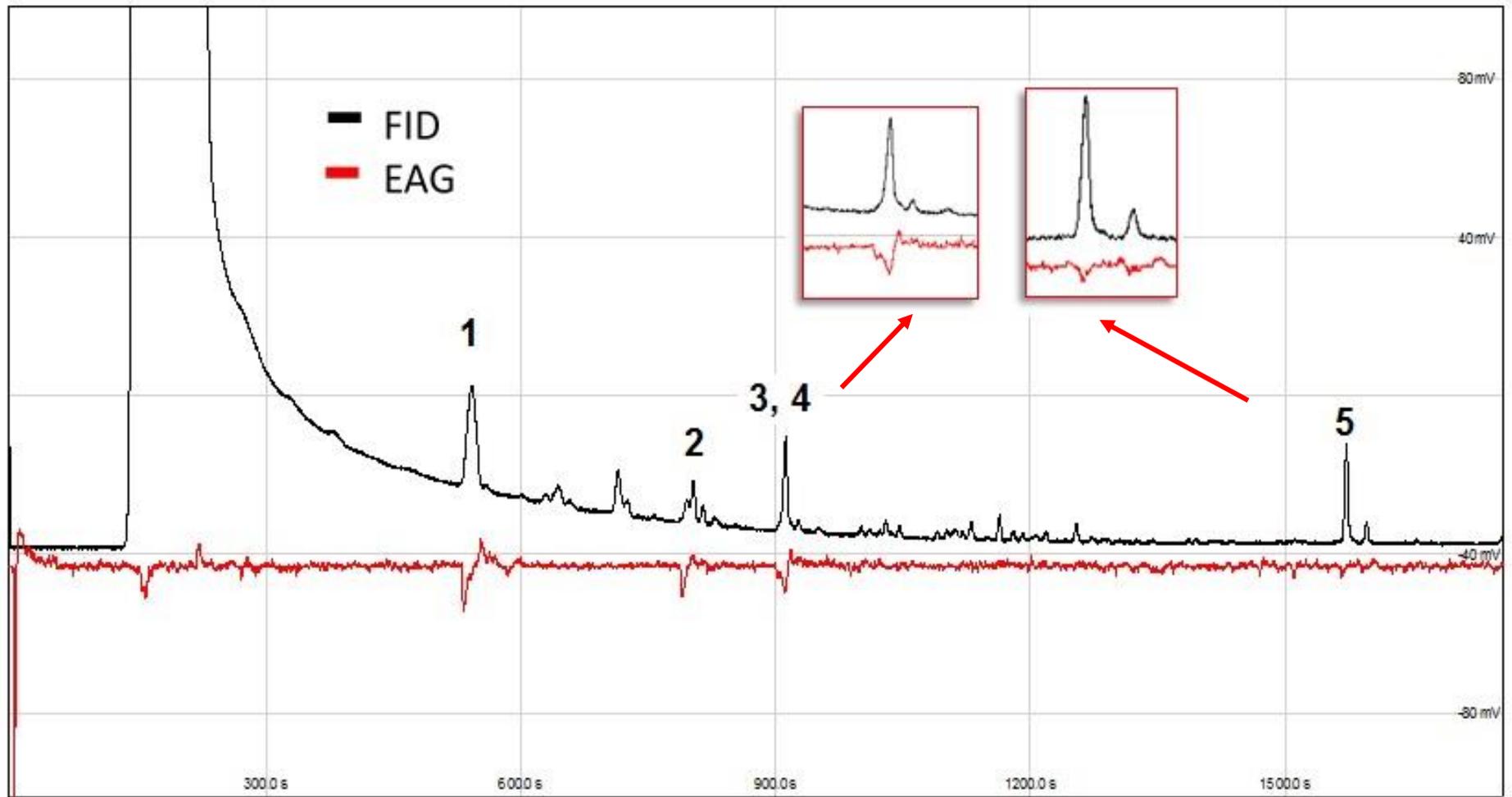
estatísticas significativas entre os tratamentos em uma mesma repetição. Todas as análises estatísticas foram executadas com o software *Assistat 7.7*.

## **RESULTADOS**

### **Análise da resposta eletrofisiológica de fêmeas de *A. obliqua* por CG-EAG**

As análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Eletroantenografia (CG-EAG), conduzidas com fêmeas virgens de *A. obliqua* e extratos hexânicos de machos coespecíficos, revelaram que cinco compostos geraram despolarização nas antenas das fêmeas. Destes compostos, quatro são álcoois: **(1)** 1-heptanol, **(2)** linalol, **(3)** (*Z*)-3-nonen-1-ol e **(4)** (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol) e um é o sesquiterpeno,  $\alpha$ -farneseno **(5)** (Figura 1).

**Figura 1** – Identificação de compostos EAD ativos na mistura feromonal liberada por machos de *A. obliqua*.

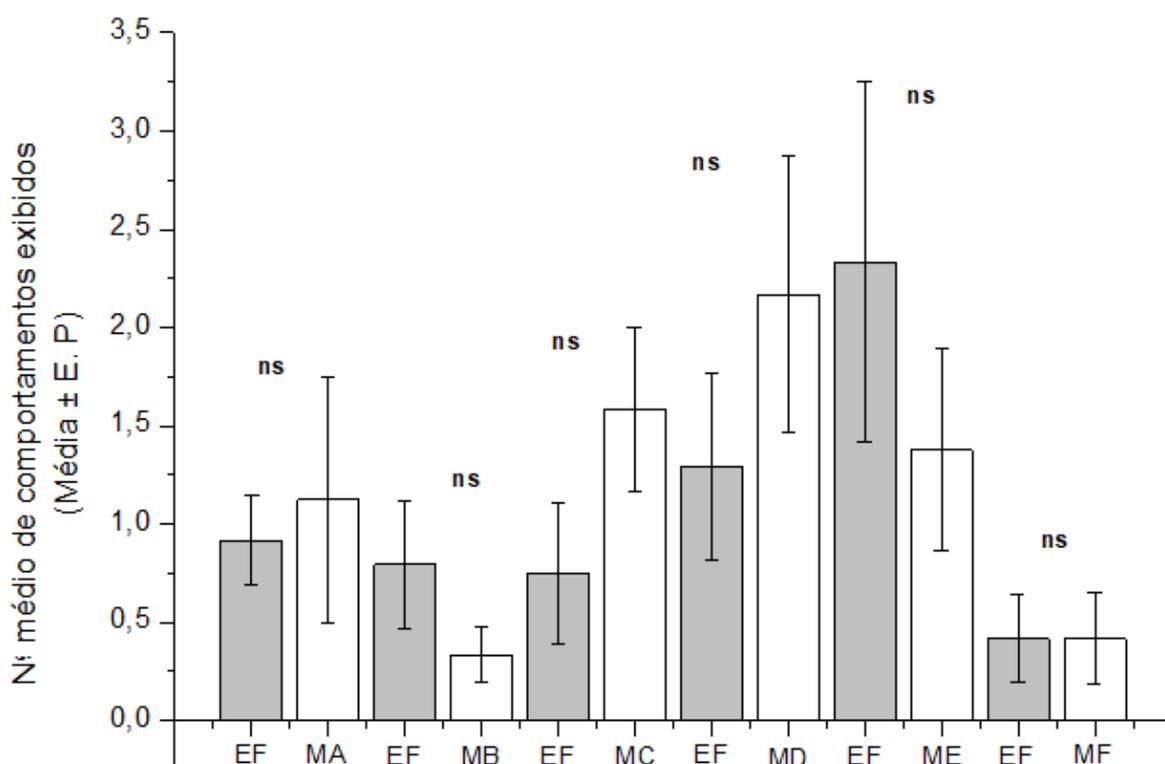


**Nota:** (1) – 1-heptanol; (2) – linalol; (3) (*Z*)-3-nonen-1-ol; (4) – (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol; (5) -  $\alpha$ -farneseno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia

### Atratividade de fêmeas de *A. obliqua* para as formulações

Os resultados mostraram que as formulações **MA**, **MB**, **MC**, **MD**, **ME** e **MF** foram tão atraentes quanto o extrato do feromônio dos machos para fêmeas coespecíficas (Figura 2) ( $Z_{MA}= 0,434$ ,  $Z_{MB}=1,834$ ,  $Z_{MC}= 1,487$ ,  $Z_{MD}= 0,115$ ,  $Z_{ME}= 0,201$  e  $Z_{MF}= 0$ ).

**Figura 2** – Atratividade de fêmeas virgens de *A. obliqua* para misturas



**Nota:** EF- extrato da aeração dos compostos voláteis liberados por machos. **MA** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno), **MB** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol), **MC** (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol e  $\alpha$ -farneseno), **MD** (1-heptanol, linalol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno), **ME** (1-heptanol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno) e **MF** ( linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno) ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Os machos de *A. obliqua* emitem uma complexa mistura feromonal, entretanto as fêmeas coespecíficas, responderam eletrofisiologicamente apenas aos compostos pertencentes a dois grupos, os álcoois (1-heptanol, linalol, (Z)-3-nonen-1-ol, (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol) e o sesquiterpeno ( $\alpha$ -farneseno), sugerindo que nem todos os compostos presentes na mistura feromonal dos machos sejam essenciais (LÓPEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013; RENO, 2014). Resultados similares, foram reportados para outras espécies de moscas das frutas, nos quais as fêmeas respondem eletrofisiologicamente, a uma quantidade extremamente menor de compostos, como é o caso das espécies *A. fraterculus* e *A. striata* (MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2015).

Dentre os compostos identificados neste trabalho, dois já foram reportados como EAD-ativos na mistura feromonal de *A. obliqua* de uma população mexicana por López-Guillén *et al.* (2011), sendo eles o (Z)-3-nonen-1-ol e o  $\alpha$ -farneseno, os outros três compostos, 1-heptanol, linalol e o (E,Z)-3,6-nonadien-1-ol foram identificados nos extratos de aeração de machos de uma população brasileira (GONÇALVES *et al.*, 2013). Estes resultados demonstram que há uma similaridade nos compostos identificados por espécies de diferentes países mesmo sabendo que as condições ambientais, o estado fisiológico do inseto e inclusive experiências anteriores do inseto, podem interferir na composição química da mistura feromonal (VANÍČKOVÁ *et al.*, 2012; RENO, 2014; REYES *et al.*, 2017).

Curiosamente, os componentes EAD ativos destes trabalhos já foram identificados como ativos em extratos de frutos hospedeiros de moscas das frutas. O composto 3,6-nonadien-1-ol foi EAD-ativo no extrato do fruto de manga para fêmeas de *Bactrocera invadens* (BIASAZIN *et al.* 2014). Linz *et al.* (2013) demonstraram que o linalol e outros compostos, estimularam respostas antenais em quatro espécies de moscas pertencentes ao gênero *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *D. orena* e *D. erecta*. O linalol também foi ativo para *A. ludens*, sendo um dos componentes de uma mistura sintética empregada no monitoramento desta praga (GONZÁLEZ *et al.*, 2006, RASGADO *et al.*, 2009). Esta semelhança, que comprova que existem compostos comuns aos frutos e ao feromônio, corrobora com a hipótese de que tais componentes possam ter sido sequestrados do fruto, como já foi descrito para a espécie de *B. dorsalis* (NISHIDA *et al.*, 1988).

As formulações das misturas foram testadas para avaliar o efeito de redundância dos compostos, determinando se todos são essenciais na atração de fêmeas. Os resultados

mostram que as seis misturas testadas foram tão atraentes quanto o extrato do feromônio dos machos, corroborando com a ideia de que todos os componentes são essenciais para mistura uma vez que a ausência deles não gerou uma menor atratividade das fêmeas. Esperava-se que a ausência do componente 1-heptanol na mistura MF diminuísse a atratividade das fêmeas, uma vez que este é um componente majoritário que representa cerca de 60% da mistura feromonal, entretanto observou-se que os componentes que estão em quantidades menores no extrato são tão importantes para a mistura quanto o 1-heptanol ( GONÇALVES *et al.*, 2013).

Diversos estudos demonstram a especificidade e sensibilidade na identificação química das moscas das frutas e por isso observa-se que os componentes minoritários nos extratos feromonais, são tão essenciais quanto os majoritários (SCHRÖDER & HILKER, 2008; BEYAERT *et al.*, 2010; REYES *et al.*, 2017). No estudo realizado por Robacker *et al.* 2009 com a espécie *A. serpentina* um dos compostos majoritários da mistura feromonal, 3,6-diidro-2,5-dimetilpirazina, não apresentou atividade eletroantegráfica e o composto minoritário trimetilpirazina (TMP) apresentou atividade antenal. No que se refere a composição feromonal de *A. striata* apenas os compostos majoritários da mistura foram EAD ativos para fêmeas coespecíficas (CRUZ-LOPEZ *et al.*, 2015).

Em conclusão, este trabalho identificou cinco componentes que constituem a mistura feromonal de machos de *A. obliqua*, dos quais três ainda não tinham sido comprovados como atraentes para fêmeas. Além disso, estes resultados indicam que diferentes misturas podem ser atraentes para uma mesma espécie quando apresentam uma composição química, proporção e concentração ideais. Os resultados deste estudo sugerem que estes compostos sejam essenciais na interação entre machos e fêmeas desta espécie além de constituírem um potencial produto, baseado nos semioquímicos, para o uso no controle desta praga.

## REFERÊNCIAS

- ARZUFFI, RENÉ; ROBLEDO, NORMA; VALDEZ, JORGE. Antennal sensilla of *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, p. 669-673, 2008.
- BATTISTE, M. A., STREKOWSKI, L., VANDERBILT, D. P., VISNICK, M., KING, R. W., & NATION, J. L. Anastrephin and epianastrephin, novel lactone components isolated from the sex pheromone blend of male Caribbean and Mexican fruit flies. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 26, p. 2611-2614, 1983.
- BEYAERT, I., WÄSCHKE, N., SCHOLZ, A., VARAMA, M., REINECKE, A., & HILKER, M. Relevance of resource-indicating key volatiles and habitat odour for insect orientation. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 5, p. 1077-1086, 2010.
- BIASAZIN, T. D., KARLSSON, M. F., HILLBUR, Y., SEYOUM, E., & DEKKER, T. Identification of host blends that attract the African invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 9, p. 966-976, 2012.
- BIGIANI, A., SCALERA, G., CRNJAR, R., BARBAROSSA, I. T., MAGHERINI, P. C., & PIETRA, P. Distribution and function of the antennal olfactory sensilla in *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Trypetidae). **Italian Journal of zoology**, v. 56, n. 4, p. 305-311, 1989.
- BOSSERT, W. H., & WILSON, E. O. The analysis of olfactory communication among animals. **Journal of theoretical biology**, v. 5, n. 3, p. 443-469, 1963.
- BRUCE, Toby JA; PICKETT, John A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1605-1611, 2011.
- CASTREJÓN-GOMÉZ, V. R. Comportamiento sexual y volátiles emitidos por dos especies de insectos asociados al chicozapote, *Manilkara zapota* L. Van Royen (Ebenales: Sapotaceae). Tesis de doutorado, El Colegio de la Frontera Sur, 2006.
- CRUZ-LÓPEZ L, MALO EA, ROJAS J. C. Sex pheromone of *Anastrepha striata*. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 5, p. 458-464, 2015.
- CRUZ-LÓPEZ, LEOPOLDO *et al.* A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 2, p. 351-365, 2006.
- DIAZ-SANTIZ, E., ROJAS, J. C., CRUZ-LÓPEZ, L., HERNÁNDEZ, E., & MALO, E. A. Olfactory response of *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) to guava and sweet orange volatiles. **Insect science**, v. 23, n. 5, p. 720-727, 2016.
- DICKENS, J. C., HART, W. G., LIGHT, D. M., & JANG, E. B. Tephritid olfaction: morphology of the antennae of four tropical species of economic importance (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 81, n. 2, p. 325-331, 1988.
- GONÇALVES, G. B., SILVA, C. E., MENDONÇA, A. D. L., VANÍČKOVÁ, L., TOMČALA, A., & DO NASCIMENTO, R. R. Pheromone communication in *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae): A comparison of the volatiles and salivary gland extracts of two wild populations. **Florida Entomologist**, p. 1365-1374, 2013.

GONZÁLEZ, R., TOLEDO, J., CRUZ-LOPEZ, L., VIRGEN, A., SANTIESTEBAN, A., & MALO, E. A. A new blend of white sapote fruit volatiles as potential attractant to *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 99, n. 6, p. 1994-2001, 2006.

HALLBERG, E., J. N. C. VANDER PERS, AND G. E. HANIO-HANSSON, B., AND T. A. CHRISTENSEN. Functional characteristics of the antennal lobe. In: **Insect olfaction**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. p. 125-161.

HEATH, R. R., LANDOLT, P. J., ROBACKER, D. C., DUEBEN, B. D., & EPSKY, N. D. Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. **Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior**. CRC-Press, Boca Raton, FL, USA, p. 793-809, 2000.

JOHANSSON, B. G., & JONES, T. M. The role of chemical communication in mate choice. **Biological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 265-289, 2007.

LAING, D. G., PANHUBER, H., WILLCOX, M. E., & PITTMAN, E. A. Quality and intensity of binary odor mixtures. **Physiology & behavior**, v. 33, n. 2, p. 309-319, 1984.

LIMA, I. S., HOWSE, P. E., AND DO NASCIMENTO, R. R. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied.(Diptera: Tephritidae): identification and behavioural activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 196-201, 2001.

LINZ, J., BASCHWITZ, A., STRUTZ, A., DWECK, H. K., SACHSE, S., HANSSON, B. S., & STENSMYR, M. C. Host plant-driven sensory specialization in *Drosophila erecta*. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 280, n. 1760, p. 20130626, 2013.

LÓPEZ-GUILLÉN, G., CRUZ-LÓPEZ, L., MALO, E. A., AND ROJAS, J. C. 2011. Olfactory responses of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) to volatiles emitted by calling males. **Florida Entomologist**, p. 874-881, 2011.

MAYO, I., M. ANDERSON, J. BURGUETE, AND E. M. ROBLES-CHILLIDA. Structure of superficial chemoreceptive sensilla on the third antennal segment of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 16, n. 2, p. 131-141, 1987.

MILET-PINHEIRO, P., NAVARRO, D. M., DE AQUINO, N. C., FERREIRA, L. L., TAVARES, R. F., DA SILVA, R. D. C. C., ... & Do Nascimento, R. R. Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Chemoecology**, v. 25, n. 3, p. 115-122, 2015.

NATION, J. L. Sex pheromone of the Caribbean fruit fly: chemistry and field ecology. In: **Natural Products**. Pergamon, 1983. p. 109-110.

NATION, J. L. Biology of pheromone release by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). **Journal of chemical ecology**, v. 16, n. 2, p. 553-572, 1990.

NISHIDA R, TAN KH, LAJIS NH, SUKARI AM, TAKAHASHI S, FUKAMI H. Accumulation of phenylpropanoids in the rectal glands of males of the Oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*. **Experientia**, v. 44, n. 6, p. 534-536, 1988.

RASGADO, M. A., MALO, E. A., CRUZ-LÓPEZ, L., ROJAS, J. C., & TOLEDO, J. Olfactory response of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to *Citrus aurantium* volatiles. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 2, p. 585-594, 2009.

RENOU, M. Pheromones and general odor perception in insects. **Neurobiology of chemical communication**, p. 23, 2014.

REYES, H., MALO, E. A., TOLEDO, J., CRUZ-ESTEBAN, S., & ROJAS, J. C. Physiological state influences the antennal response of *Anastrepha obliqua* to male and host volatiles. **Physiological entomology**, v. 42, n. 1, p. 17-25, 2017

ROBACKER DC, ALUJA M, COSSÉ AA, SACCHETTI P. Sex pheromone investigation of *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 3, p. 560-566, 2009.

ROCCA, J. R., NATION, J. L., STREKOWSKI, L., AND BATTISTE, M. A. Comparison of volatiles emitted by male Caribbean and Mexican fruit flies. **Journal of chemical ecology**, v. 18, n. 2, p. 223-244, 1992.

ROJAS, J., J. VALDEZ, F. CASTREJÓN, AND M. CAMINO. Sénsulos de la antena de *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae), pp. 135-141 In M. Vargas, O. J Polaco, and G. Zuñiga [eds.], **Contribuciones Entomológicas**. 2001.

SCHRÖDER, R., & HILKER, M. The relevance of background odor in resource location by insects: a behavioral approach. **Bioscience**, v. 58, n. 4, p. 308-316, 2008.

TILLMAN, J. A., SEYBOLD, S. J., JURENKA, R. A., & BLOMQUIST, G. J. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 6, p. 481-514, 1999.

VANÍČKOVÁ, L., DO NASCIMENTO, R. R., HOSKOVEC, M., JEŽKOVÁ, Z., BŘÍZOVÁ, R., TOMČALA, A., & KALINOVÁ, B. Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of the medfly sex pheromone. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7168-7176, 2012.

ZUCCHI, R.A. 2012. Fruit flies in Brazil - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly. Disponível em: [www.lea.esalq.usp.br/ceratitiss/](http://www.lea.esalq.usp.br/ceratitiss/). Acessado em 23 de novembro de 2018.

#### **4. CAPÍTULO II - Atração de fêmeas de *Anastrepha obliqua* para frutos hospedeiros**

## Atração de fêmeas de *Anastrepha obliqua* para frutos hospedeiros

NATHALY C. DE AQUINO<sup>1</sup>; LUANA L. FERREIRA<sup>1</sup>; RAPHAEL DE F. TAVARES<sup>2</sup> ; ADRIANA DE L. MENDONÇA<sup>3</sup>; PAULO MILET- PINHEIRO<sup>4</sup> ; DANIELA M. DO A. F. NAVARRO<sup>5</sup> ;RUTH R. DO NASCIMENTO<sup>6</sup>

1. Doutoranda - Renorbio.
2. Doutorando em Química e Biotecnologia - PPGQB-UFAL
3. Prof<sup>a</sup> Dra. - Centro Universitário Tiradentes
4. Pesquisador (PNPD) - Departamento de Botânica da UFPE
5. Prof<sup>a</sup> Dra. - Departamento de Química Fundamental da UFPE
6. Prof<sup>a</sup> Dra. Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL

### RESUMO

A fruticultura é essencial para países que apresentam o agronegócio como um setor significativo para a economia, cuja diversidade de clima, solos e condições ecológicas são fatores decisivos para a produção com uma maior variedade de espécies de frutas, como é o caso do Brasil. Um outro fator decisivo é o controle de pragas e, neste contexto, as moscas das frutas destacam-se como pragas da fruticultura mundial devido aos grandes prejuízos provocados em culturas de importância econômica, os quais resultam da queda precoce e depreciação de frutos para o consumo *in natura* e industrialização. Dentre estas pragas, a espécie *A. obliqua* destaca-se por ser considerada economicamente como um dos tefritídeos mais problemáticos na América do Sul, devido a sua capacidade de adaptação e polifagia. Deste modo, o presente estudo objetivou identificar os componentes atrativos para fêmeas de *Anastrepha obliqua* a partir dos compostos voláteis liberados pelos hospedeiros de goiaba, carambola e manga. As análises de eletroantenografia demonstraram a despolarização da antena para os compostos pineno, butirato de etila,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -cariofileno no extrato do fruto de goiaba,  $\beta$ -mirceno, linalol, ocimeno e octanoato de etila para o fruto de carambola e  $\alpha$ - pineno,  $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno no fruto de manga. Nos testes com as formulações das misturas dos compostos EAD ativos nos extratos dos frutos, resultaram em doze misturas tão atraentes quanto os seus respectivos extratos, além disso as formulações M6G e M1M foram tão atraentes quanto o controle. Os resultados desta pesquisa demonstram a sensibilidade e especificidade na detecção dos compostos dentro de uma complexa mistura como a dos frutos hospedeiros indicando que há misturas menos complexas do que os extratos dos frutos que são capazes de atrair fêmeas coespecíficas.

**Palavras-chave:** moscas das frutas, cairomônios, goiaba, carambola, manga

## INTRODUÇÃO

Atualmente a crescente demanda social por produtos naturais que proporcione melhor qualidade de vida tem impulsionado pesquisas na busca de novas tecnologias que permitam a diminuição de perdas econômicas na cadeia produtiva e no impacto da atividade industrial ao meio ambiente (MELO, 2010). No que se refere as perdas econômicas, no âmbito da produção de frutas, os problemas de ordem fitossanitária que envolvem as medidas quarentenárias impostas pelos países importadores, objetivando impedir a introdução de espécies exóticas como as moscas das frutas (Diptera: Tephritidae) em seus territórios, tem se destacado em todo mundo (CARVALHO, 2005).

Os dípteros da família Tephritidae estão entre as pragas de maior importância econômica e quarentenária, com ênfase para o gênero *Anastrepha* que apresenta o maior número de espécies registradas, totalizando mais de 300 que são conhecidas no continente americano (GODOY *et al.*, 2011; WHARTON & YODER, 2013; NORRBOM *et al.*, 2015). Dentre as espécies de importância econômica *A. obliqua* (Macquart, 1835) é responsável por grandes prejuízos à fruticultura, devido a oviposição realizada pelas fêmeas que causam a depreciação e queda prematura do fruto, tornando-o inviável para o comércio e para a indústria (MALAVASI *et al.*, 2000; ALUJA & MANGAN, 2008).

*A. obliqua* infesta espécies de muitas famílias de plantas, sendo considerada uma praga polífaga e por este motivo está mais amplamente distribuída quando comparada com as espécies classificadas como especialistas, podendo haver uma diferença na associação entre hospedeiro e a praga dependendo da região na qual ela está inserida (MALAVASI *et al.*, 1980; SELIVON, 2000). A polifagia pode ser evidenciada em alguns estudos que demonstram que diferentes espécies de moscas das frutas são atraídas pelos compostos voláteis emitidos por seus hospedeiros (ROBACKER *et al.*, 1990; ROBACKER, *et al.*, 1992; WARTHEN *et al.*, 1997; PROKOPY *et al.*, 1998; MALO *et al.*, 2005; CRUZ-LOPEZ *et al.* 2006; RASGADO *et al.*, 2009). Dentre os frutos hospedeiros de *A. obliqua* encontram-se os frutos de goiaba (*Psidium guajava*), carambola (*Averrhoa carambola*) e manga (*Mangifera indica*) que são frutos ricos em vitaminas sendo economicamente importante em muitos países tropicais em todas as estações do ano devido ao seu uso em uma ampla gama de produtos alimentícios (PINO *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2010; PEREIRA & KAVATI, 2011; KIST *et al.*, 2018).

Desta forma, o presente trabalho objetivou identificar componentes eletrosiologicamente ativos nos hospedeiros de *A. obliqua* que sejam atraentes em testes

comportamentais para fêmeas homoespecíficas. Para tanto, utilizou-se ferramentas analíticas como a Cromatografia Gasosa acoplada a Eletroantenografia (CG-EAG) para fazer uma varredura por compostos potencialmente envolvidos no reconhecimento dos hospedeiros e em seguida foi realizada a identificação química dos compostos pelo uso de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) e a avaliação comportamental do inseto através de bioensaios em condições de laboratório.

## **MÉTODOS E MATERIAIS**

### **Coleta do material biológico e manutenção dos insetos**

Frutos infestados com larvas de uma população selvagem de *A. obliqua* foram coletados diretamente de um pomar de goiabas localizado na cidade de Maceió (9°36'02.9"S, 35°46'13.2"W - Santa Amélia), no estado de Alagoas. Estes foram colocados em caixas separadas (44 × 35 × 25 cm) feitas de poliestireno expandido, para esperar o estágio de pupação contendo uma mistura de areia lavada e vermiculita. As larvas, que foram capazes de empupar emergiram e foram colocadas em aquários de vidro, (30 × 20 × 15 cm), mantidos no laboratório de Ecologia Química, da Universidade Federal de Alagoas, à temperatura de 25 ± 1 ° C e umidade relativa de 60%. As moscas foram mantidas com uma dieta constituída por uma mistura de extrato de soja, açúcar, levedo de cerveja e germe de trigo na proporção (3:3:1:1) juntamente com água e fruto *in natura* para a domesticação da população. A troca de alimentação foi realizada duas vezes por semana e a troca de gaiolas a cada 15 dias. Em todos os testes, as moscas acasaladas foram usadas com 10 a 20 dias de idade.

### **Coleta dos voláteis dos frutos**

A técnica de aeração foi empregada para a coleta dos compostos voláteis liberados por frutos sadios de goiaba, carambola e manga. Para tanto, aproximadamente 250 g do fruto no estágio intermediário de maturação foram colocados em um dessecador de vidro (180 mm de altura × 200 mm de diâmetro). A entrada do dessecador é modificada pela adição de um tubo de entrada contendo 150mg de Tenax<sup>®</sup> com diâmetro poroso de 60-80 mesh para adsorver os compostos voláteis liberados. O ar no interior do dessecador, contendo os compostos voláteis liberados pelos frutos, foi sugado através de uma bomba de ar (Resun<sup>®</sup> AC 2600), acoplada a um medidor de fluxo constante (Supelco<sup>®</sup> 0,5 L/min) por 24 horas e por último foi adsorvido no filtro contendo Tenax<sup>®</sup>. Os compostos voláteis, adsorvidos no Tenax, foram dessorvidos com 2 mL do solvente hexano grau HPLC bidestilado. Para cada aeração dos frutos foram

coletadas dez amostras, as quais posteriormente foram armazenadas em ampolas de vidro, seladas e mantidas em freezer (-5°C) para utilização em experimentos subsequentes.

### **Cromatografia Gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica (GC-EAG)**

A fim de identificar os constituintes químicos, presentes nos extratos de frutos hospedeiros, análises foram conduzidas empregando um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Eletroanténógrafo (GC-EAG). Nos experimentos foram utilizadas antenas de fêmeas com 10-20 dias de idade. Os extratos hexânicos dos frutos hospedeiros foram injetados em um cromatógrafo Gasoso Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Milão, Itália) equipado com uma coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm film, ValcoBond) sob o modo *splitless*. Ao final da corrida, o fluxo que saía da coluna foi dividido (split) em duas partes, sendo que uma parte direcionada para o DIC (Detector de ionização de Chamas) onde o cromatograma é registrado e a outra parte foi para o EAG, onde a resposta da antena é amplificada de forma simultânea.

### **Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)**

Aliquotas de 1 µL dos extratos hexânicos dos frutos foram analisadas, sob o modo *splitless*, por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS) com o objetivo de identificar os compostos que eliciam despolarização da antena. As análises foram feitas em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (GC-MS; Agilent 7890ATM gas chromatograph, Agilent 5975C Series MSDTM mass spectrometer, Palo Alto, USA), com uma coluna apolar HP-5 com temperatura inicial e final de 40 °C e 230 °C respectivamente com o gás hélio utilizado como gás de arraste, conforme descrito no capítulo I. Os dados foram processados e visualizados pelo emprego dos softwares Agilent MSD Productivity ChemStation Agilent Technologies, Palo Alto, EUA. Uma série de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>; Sigma-Aldrich) foram coinjetados com amostras autênticas, para determinar os seus índices de retenção, os quais foram utilizados na identificação dos compostos bioativos, juntamente com as informações obtidas a partir de análises dos padrões de fragmentação destes compostos e de consulta as bibliotecas dos instrumentos (NIST08, Adams (2007) e Wiley Registry™ versão 9).

### Testes comportamentais em laboratório

Os testes comportamentais foram realizados com compostos sintéticos obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich (grau de pureza 98,5%). As formulações individuais e suas respectivas misturas, foram testadas através de bioensaios de dupla escolha realizados em arenas de vidro (45 cm x 30 cm x 30 cm) cobertas com tecido *voil* no horário entre as 14:00-16:00 h. As formulações testadas (tratamentos) foram penduradas nas extremidades da arena, de maneira equidistante (30 cm). O extrato do fruto serviu como tratamento-testemunha (controle positivo) e como controle negativo o eppendorf contendo o polímero adsorvente (substrato). As seis fêmeas acasaladas de *A. obliqua*, utilizadas durante os bioensaios, foram pintadas com tintas atóxicas (Acrilex<sup>®</sup>) e usadas uma única vez em cada bioensaio, o qual teve duração de 20 minutos. Os comportamentos registrados foram de pouso e permanência na fonte de odor, os quais foram caracterizados como comportamento de atração. Para cada mistura foram utilizados 10 mg de um substrato biopolimérico para o preparo das formulações que após a evaporação do solvente resultaram em uma dose de 10 ng. Os componentes de cada formulação foram determinados para saber o efeito de redundância de cada composto na mistura, ou seja, determinar os componentes que são essenciais na atração das fêmeas. Nas formulações das misturas com compostos EAD ativos nos extratos dos frutos de goiaba, carambola e manga (Tabela 1), foram mantidas as proporções do fruto, nas formulações de goiaba, as proporções foram de 8:7:3:88 para butirato de etila,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -cariofileno, respectivamente; na carambola os componentes foram  $\beta$ -mirceno, linalol, ocimeno e octanoato de etila nas respectivas proporções 1:1:1,5;16,39; na manga os compostos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno nas respectivas proporções 11,57:66,66:1:1. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições com o objetivo de avaliar a atratividade simultânea das fêmeas acasaladas para dois tratamentos diferentes.

**Tabela 1-** Formulações de compostos EAD ativos nos extratos de goiaba, carambola e manga

<b>Goiaba</b>
M1G: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, $\beta$ -cariofileno, $\beta$ -mirceno e butirato de etila
M2G: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, $\beta$ -mirceno e butirato de etila
M3G: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, $\beta$ -cariofileno e $\beta$ -mirceno
M4G: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -cariofileno, $\beta$ -mirceno e butirato de etila
M5G: $\beta$ -pineno, $\beta$ -cariofileno, $\beta$ -mirceno e butirato de etila
M6G: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, $\beta$ -cariofileno e butirato de etila
<b>Carambola</b>
M1C: $\beta$ -mirceno, linalol, ocimeno e octanoato de etila
M2C: $\beta$ -mirceno, linalol e octanoato de etila
M3C: $\beta$ -mirceno, linalol e ocimeno
M4C: $\beta$ -mirceno, ocimeno e octanoato de etila
M5C: linalol, ocimeno e octanoato de etila
<b>Manga</b>
M1M: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno
M2M: $\alpha$ -pineno, canfeno e sabineno
M3M: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -mirceno e canfeno
M4M: $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno
M5M: $\alpha$ -pineno, $\beta$ -mirceno e sabineno

### **Análise estatística**

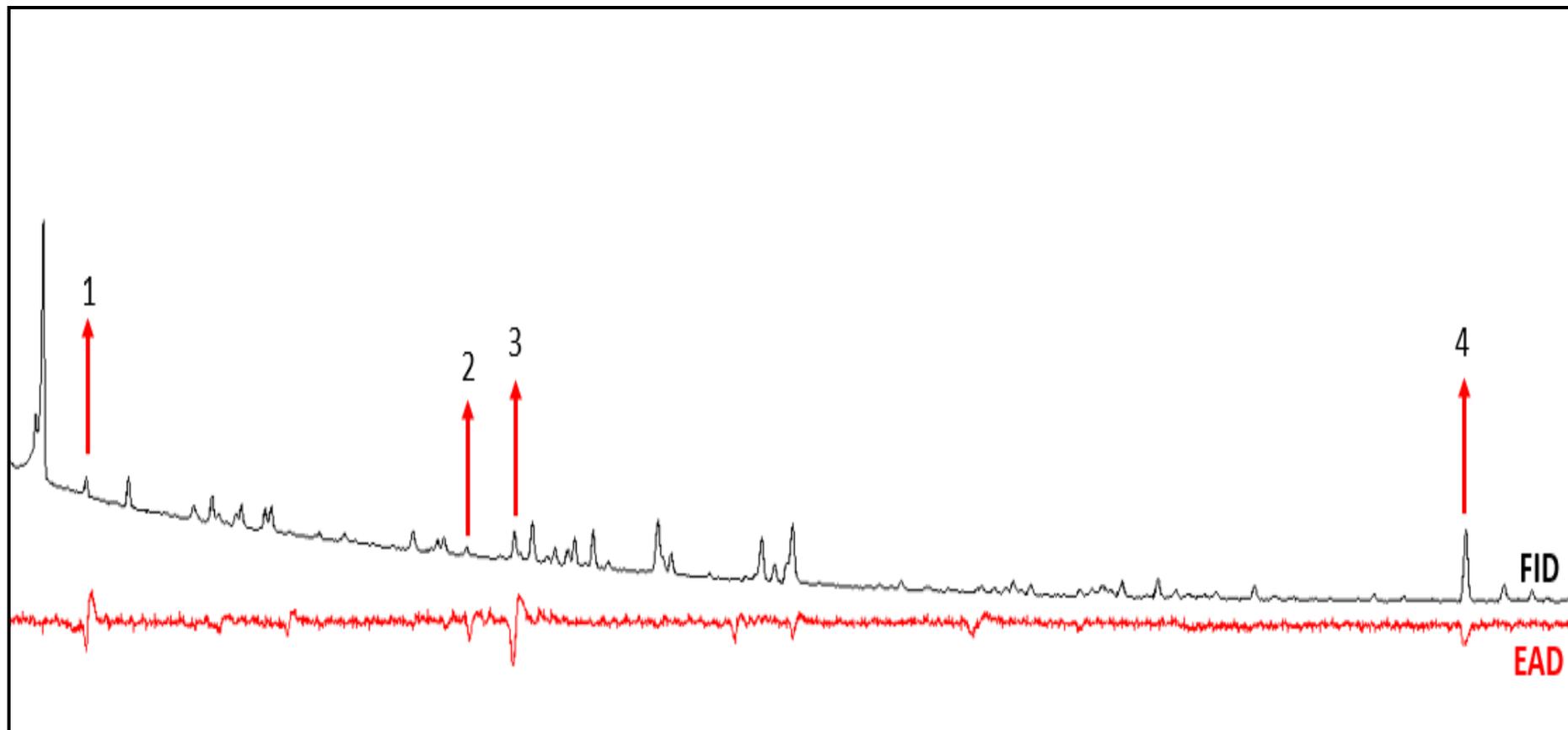
As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software *Assistat 7.7*. Inicialmente foram aplicados os testes de Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ) com o objetivo de avaliar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Os resultados atenderam os parâmetros de normalidade e homogeneidade, permitindo a aplicação do teste de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ) para verificação de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e controle em uma mesma repetição.

## **RESULTADOS**

### **Identificação de compostos eletrofisiologicamente ativos**

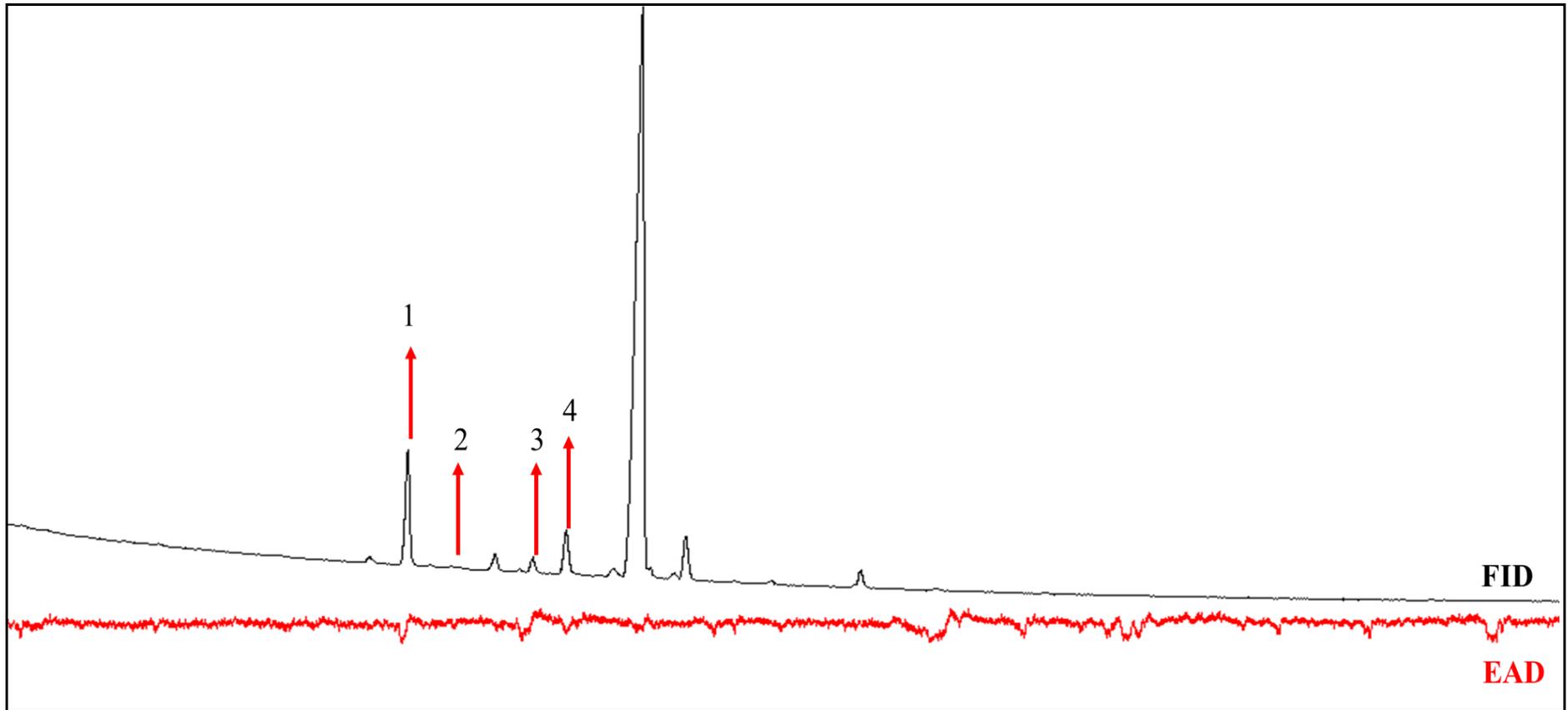
Pelo uso da técnica de eletroantenografia, foram identificados compostos ativos nos frutos de manga, goiaba e carambola. No extrato do fruto de goiaba os compostos identificados foram: butirato de etila,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -cariofileno (Figura 1); no extrato de manga  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno e  $\beta$ -mirceno (Figura 2); no extrato de carambola  $\beta$ -mirceno, octanoato de etila, ocimeno e linalol (Figura 3).

**Figura 1-** Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de goiaba



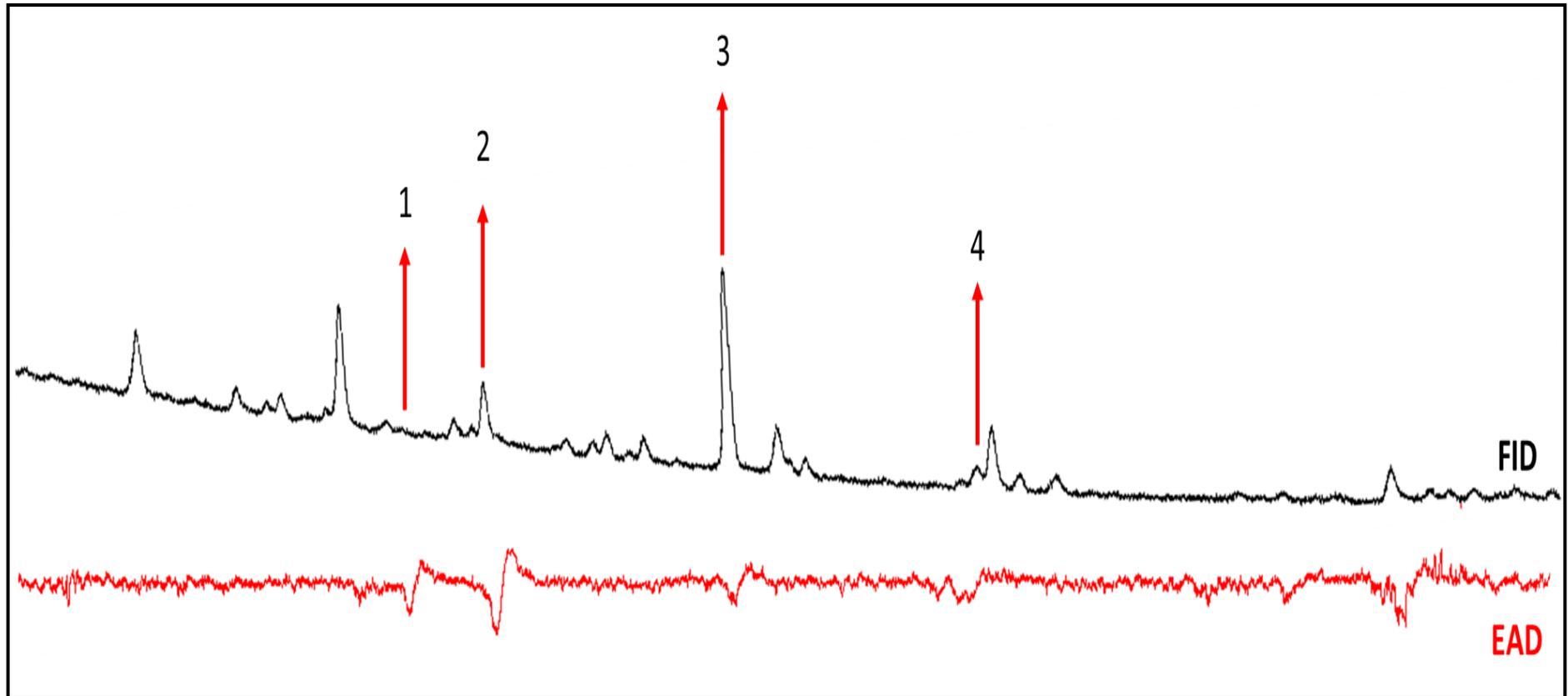
**Nota:** (1) Butirato de etila, (2)  $\alpha$ -Pino e  $\beta$ -Pino, (3)  $\beta$ -Mirceno e (4)  $\beta$ -Cariofileno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia.

**Figura 2** - Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de manga



**Nota:** (1)  $\alpha$ -Pineno, (2) canfeno, (3) sabineno e (4)  $\beta$ -Mirceno. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia

**Figura 3** - Compostos EAD-ativos na mistura volátil liberada por frutos de carambola

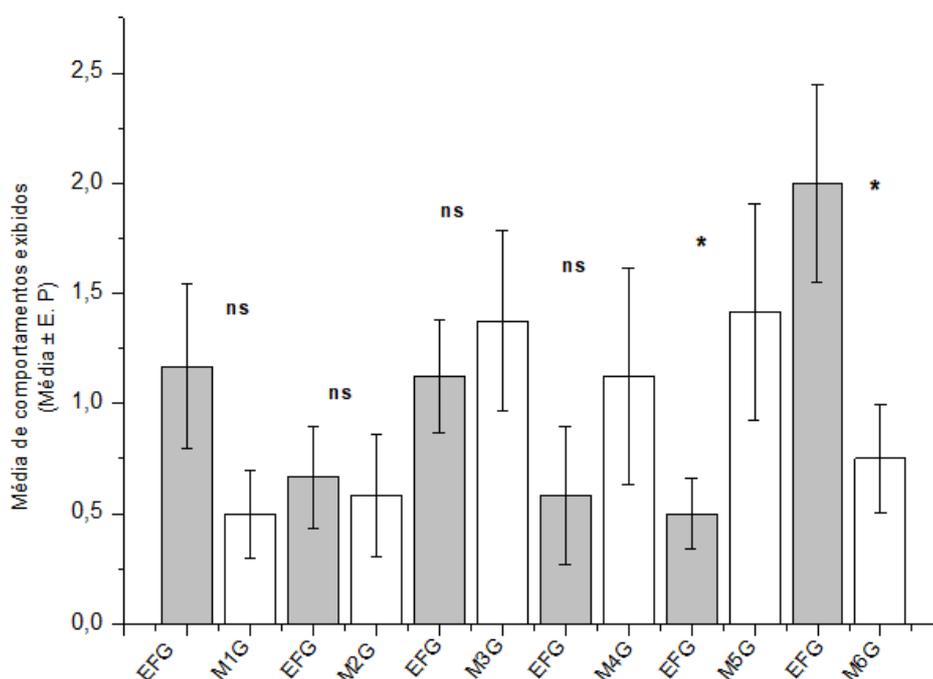


**Nota:** (1)  $\beta$ -Mirceno, (2) octanoato de etila, (3) ocimeno e (4) linalol. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia. FID: detector de ionização de chamas; EAG: Eletroantenografia.

## Testes comportamentais com misturas

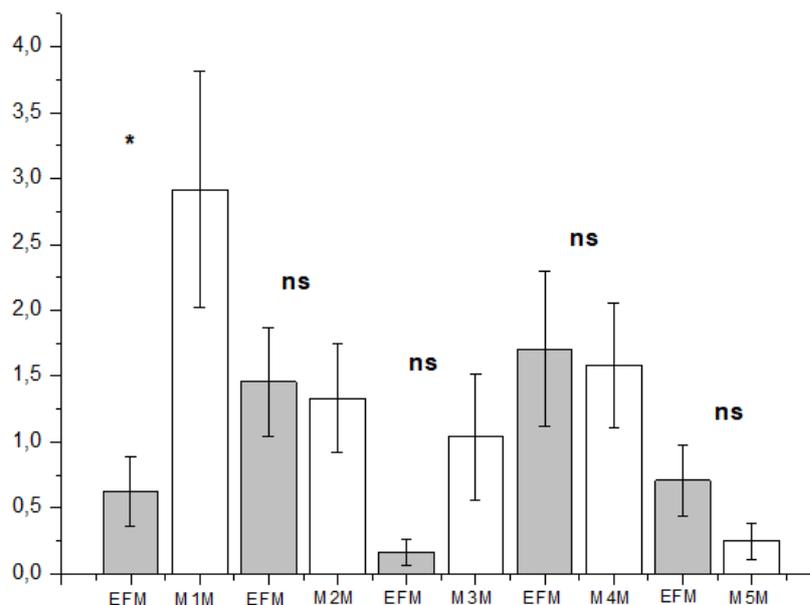
Os resultados com as formulações das misturas do extrato do fruto de goiaba demonstraram que as misturas M1G, M2G, M3G, M4G foram tão atrativas quanto o extrato do fruto de goiaba (Figura 4) ( $Z_{M1G}= 1,745$ ,  $Z_{M2G}= 0,205$ ,  $Z_{M3G}= 0,530$  e  $Z_{M4G}= 0,952$ ). No que se refere a mistura M5G, observou-se que o extrato do fruto foi mais atraente que esta mistura e a mistura M6G foi mais atraente que o extrato ( $Z_{M5G}= 2,447$  e  $Z_{M6G}= 2,214$ ). Em relação as formulações dos frutos de manga, as formulações M2M, M3M, M4M e M5M foram tão atraentes quanto o extrato do fruto de manga e a M1M foi mais atraente que o extrato de fruto (Figura 5) ( $Z_{M1M}= 2,993$ ,  $Z_{M2M}= 0,408$ ,  $Z_{M3M}= 1,893$ ,  $Z_{M4M}= 0,221$  e  $Z_{M5M}= 1,651$ ). Em relação as formulações de carambola a M1C, M2C, M3C e M4M foram tão atraentes quanto o extrato de carambola e formulação M5C, menos atraente que o extrato do fruto (Figura 6) ( $Z_{M1C}= 0,089$ ,  $Z_{M2C}= 1,032$ ,  $Z_{M3C}= 1,105$  e  $Z_{M4M}=0$  e  $Z_{M5C}= 2,677$ ).

**Figura 4-** Testes comportamentais com misturas formuladas da goiaba



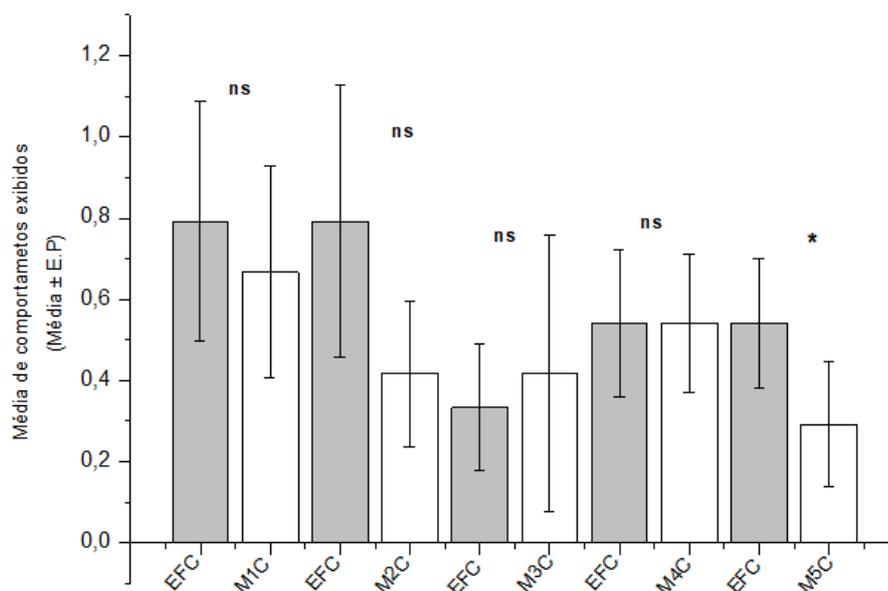
**Nota:** EFG- extrato de fruto de goiaba, M1G:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -mirceno e butirato de etila, M2G:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e butirato de etila, M3G:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -mirceno, M4G:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -mirceno e butirato de etila, M5G:  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -mirceno e butirato de etila e M6G:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno e butirato de etila. \* indicam diferenças significativas de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ). ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

**Figura 5** - Testes comportamentais com misturas formuladas da manga



**Nota:** EFM- Extrato de fruto manga, M1M:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno, M2M:  $\alpha$ -pineno, canfeno e sabineno, M3M:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e canfeno, M4M:  $\beta$ -mirceno, canfeno e sabineno e M5M:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e sabineno. \* indicam diferenças significativas de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ). ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

**Figura 6** – Testes comportamentais com misturas formuladas da carambola



**Nota:** M1C:  $\beta$ -mirceno, linalol, ocimeno e octanoato de etila, M2C:  $\beta$ -mirceno, linalol e octanoato de etila, M3C:  $\beta$ -mirceno, linalol e ocimeno, M4C:  $\beta$ -mirceno, ocimeno e octanoato de etila e M5C: linalol, ocimeno e octanoato de etila. \* indicam diferenças significativas de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ ). ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

As análises de eletroantenografia com fêmeas de *A. obliqua*, expostas aos compostos voláteis liberados pelo fruto hospedeiro de goiaba, identificaram a presença de quatro terpenóides:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -cariofileno e um éster, butirato de etila que desencadearam despolarização nas antenas. O componente butirato de etila foi reportado como EAD ativo para outras espécies de moscas das frutas (MALO *et al.* 2005, MILET-PINHEIRO *et al.* 2015, DIAZ-SANTIZ *et al.* 2016). Este éster foi identificado, juntamente com outros compostos, como eliciador de respostas antenais nos extratos de Sapote (*Casimiroa edulis*) para machos e fêmeas da espécie *A. ludens* (MALO *et al.* 2005). Além disso, o butirato de etila foi identificado por Cruz-López *et al.* (2006) como EAD ativo para machos e fêmeas de *A. obliqua* nos voláteis provenientes dos frutos de cajá (*Spondias mombin*). Outro estudo conduzido com a espécie *A. striata* identificou em laranja e goiaba compostos atraentes para fêmeas, dentre os quais o componente butirato de etila foi reportado como EAD ativo apenas nos voláteis do fruto de goiaba (DIAZ-SANTIZ *et al.* 2016). Estes resultados demonstram que o butirato de etila é reconhecido por três espécies diferentes do gênero *Anastrepha* e é liberado por dois frutos hospedeiros distintos: goiaba e cajá.

Os compostos que foram identificados como eletrofisiologicamente ativos no extrato de manga, para fêmeas acasaladas foram quatro terpenos, a saber:  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno e  $\beta$ -mirceno. A variedade de manga utilizada como controle foi a *Tommy atkins* entretanto, há registro destes compostos em outras variedades de manga (ANDRADE *et al.*, 2000, QUIJANO *et al.* 2007). Em um estudo realizado por Malo *et al.* (2012), foram feitas análises químicas de três variedades de manga, oriundas do México, nas quais foram identificados os compostos  $\alpha$ -pineno, canfeno e sabineno. Estudo semelhante foi realizado na Colômbia com um número maior de variedades de manga, neste trabalho, o composto  $\alpha$ -pineno foi encontrado em oito variedades, o canfeno em seis e o  $\beta$ -mirceno em oito (QUIJANO *et al.* 2007). No que se refere ao Brasil, foram analisadas 15 variedades de manga nas quais nove continham  $\alpha$ -pineno, outra variedade apresentava o composto sabineno e em treze variedades foi detectado o composto  $\beta$ -mirceno (ANDRADE *et al.* 2000). Estudo realizado por Ferreira *et al.* (2003), no estado de Goiás, reportou o ataque de *A. obliqua* em 6 variedades de manga, confirmando a polifagia da praga dentro da família Anacardiaceae. Além disso, um estudo realizado com a espécie *Bactrocera invadens* identificou os compostos EAD ativos em frutos hospedeiros desta espécie, caracterizando o composto  $\alpha$ -pineno como

EAD ativo para o extrato de manga e o  $\beta$ -mirceno para os extratos de manga, goiaba e laranja (BIASAZIN *et al.*, 2014). Diante desta constatação, é evidente que os compostos EAD ativos reportados neste trabalho são, na verdade, comuns a outras variedades de manga e possivelmente podem ser considerados compostos chaves que caracterizam a identificação do fruto de manga e auxiliam insetos fitófagos como é o caso de *A. obliqua* no reconhecimento do hospedeiro.

Os testes de eletroantenografia com o extrato de fruto de carambola revelaram a despolarização das antenas de fêmeas de *A. obliqua* para 4 compostos, sendo eles, um éster octanoato de etila e três monoterpenos linalol, ocimeno e  $\beta$ -mirceno. Os compostos EAD ativos no extrato de carambola, já foram reportados para outras espécies de moscas das frutas. Para a espécie *A. striata* o composto linalol foi reportado como EAD ativo no extrato do fruto de *Citrus sinensis* e o composto octanoato de etila como ativo no extrato de *Spondias mombin* para fêmeas de *A. obliqua* (ROBACKER *et al.* 1992; HEATH *et al.* 2006; CRUZ-LÓPEZ *et al.* 2006; HEATH *et al.* 2000; DIAZ-SANTIZ *et al.*, 2016).

As análises eletroantagráficas dos extratos de frutos neste trabalho, demonstram que os componentes EAD ativos para fêmeas de *A. obliqua* foram reportados como ativos para diferentes espécies de moscas das frutas em extratos de frutos hospedeiros distintos. Essa similaridade no reconhecimento dos compostos pode indicar que existem componentes chaves dentro das complexas misturas cairomonais. Entretanto, é fundamental que sejam realizados estudos mais aprofundados para confirmar esta hipótese, considerando que os componentes são comuns, mas apresentam proporções diferente em cada extrato o que pode modificar drasticamente a resposta comportamental do inseto (RENOU, 2014; BRUCE *et al.*, 2005).

Curiosamente, quando comparamos os compostos identificados nos extratos dos frutos com o feromônio de diferentes espécies, encontramos similaridade com os extratos feromonais. No que se refere aos compostos do feromônio de machos de *A. striata* existe similaridade para os componentes linalol e octanoato de etila, na espécie *C. capitata* os compostos  $\beta$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno e no feromônio de *A. frateculus*,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno e  $\beta$ -mirceno (VANÍČKOVÁ *et al.* 2012; MILET-PINHEIRO *et al.* 2015; CRUZ-LOPEZ *et al.* 2015). Esta similaridade pode está associada ao sequestro dos compostos voláteis de plantas que já foi reportada para *Bactrocera dorsalis* e *Bactrocera correcta* (NISHIDA *et al.* 1998; TOKUSHIMA *et al.*, 2010). No estudo realizado por Tokushima *et al.* (2010), foi demonstrado que o  $\beta$ -cariofileno só foi detectado nas glândulas de machos

selvagens, em machos criados em laboratório estes compostos não foram detectados, indicando que tais compostos foram sequestrados dos frutos hospedeiros, inclusive os frutos de manga e goiaba (NISHIMURA *et al.* 1989; TAMURA *et al.* 2000; SANDOVAL *et al.* 2007).

Quando comparamos os compostos EAD ativos nos extratos deste trabalho com os do Capítulo I, verificamos que há semelhança de componente EAD ativos apenas para o linalol, que foi ativo nos extratos de carambola. Além disso, observa-se que os insetos utilizados no Capítulo I são provenientes de frutos infestados de carambola e goiaba, essa constatação demonstra que o reconhecimento das fêmeas, aos componentes nos extratos dos frutos, não está associada apenas aos compostos que estão presentes em seus hospedeiros de origem, mas a uma diversidade de compostos. Essa amplitude no reconhecimento de compostos, observada neste trabalho, também pode estar relacionada ao fato de mensalmente domesticarmos populações selvagens para serem inseridas junto com as populações domesticadas mais antigas, essa inserção pode ajudar a manter as características naturais do inseto inclusive no que se refere ao reconhecimento dos voláteis liberados pelo hospedeiro e na resposta comportamental exibida pelo inseto.

Neste trabalho, identificamos 12 diferentes formulações tão atraentes para as fêmeas de *A. obliqua* quanto os extratos dos seus respectivos frutos, sendo elas M1G, M2G, M3G, M4G, M2M, M3M, M4M, M5M, M1C, M2C, M3C e M4M. A atratividade de fêmeas de forma semelhante aos extratos, também foi observada para a espécie de *A. striata*, na qual as misturas de compostos EAD ativos no extrato de goiaba foram avaliadas em testes de dupla escolha e em gaiolas de campo, nestes testes a mistura de 6 componentes, formulada de acordo com as proporções relativas presentes no fruto, não apresentou diferença estatística significativa no número de insetos capturados quando comparada a armadilhas com iscas a base de extrato do fruto demonstrando que utilizar formulações com compostos atraentes em proporções ideais pode ser uma alternativa para um potencial produto (BEYAERT *et al.* 2010; DIAZ-SANTIZ *et al.*, 2016).

No que se refere aos testes com as formulações M6G e M1M, os resultados mostram que foram mais atraentes que o extrato do fruto, da mesma forma, teste de atratividade com a espécie *Bactrocera invadens* para misturas de compostos EAD ativos presentes em frutos de manga, goiaba, banana e laranja, em dois estágios de maturação, foram avaliadas em um olfatômetro, demonstrando uma maior atração para as misturas de banana e laranja, seguido

das misturas de manga e goiaba (BIASAZIN *et al.* 2014). Os resultados com as formulações M5G e M5C foram opostos daqueles identificados para as misturas M6G e M1M, sendo elas, menos atraentes que os respectivos extratos. Essa diminuição de atratividade pode estar diretamente relacionada a ausência de componentes nas duas misturas, uma vez que o composto  $\alpha$ -pineno foi removido da mistura M5G e o  $\beta$ -mirceno foi retirado da mistura M1M, como foi demonstrado por Toledo *et al.* 2009 que nem todos os componentes propostos por Cruz-López *et al.* 2006, em uma mistura de 9 componentes do fruto do hospedeiro *Spondias mombin*, são essenciais para atração.

A evidência de que compostos presentes em hospedeiros distintos podem ser reconhecidos por diferentes espécies de moscas das frutas, serve como um indicativo de que tais compostos podem atuar principalmente em dois contextos: ora na interação interespecífica (caïromônio) e/ou em interação intraespecífica (feromônio). Neste trabalho, a comparação dos compostos que foram identificados como EAD ativos nos extratos dos frutos, sugere que a espécie *A. obliqua* apresenta um reconhecimento maior para os terpenos nos extratos de frutos testados, visto que estão presentes em 75%, 100% e 50% dos compostos EAD ativos em goiaba, manga e carambola, respectivamente. Através deste estudo observou-se que a atratividade dos insetos não está relacionada apenas ao componente, mas também a proporção, pois componentes que foram EAD ativos em um extrato de fruto também existiam em outro extrato de fruto, mas não eliciaram resposta eletrofisiológica. Estes resultados eram esperados pois cada extrato corresponde a uma nova mistura para o inseto, desencadeando respostas diferentes mesmo que existam componentes iguais, porém presentes em proporções distintas em cada mistura. De forma geral, este estudo, que abrange a interação inseto-planta, pode ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para o controle do inseto-praga *A. obliqua* através do uso de caïromônios.

## REFERÊNCIAS

- ALUJA, MARTIN; MANGAN, ROBERT L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 53, p. 473-502, 2008.
- ANDRADE, ELOISA HELENA A.; MAIA, JOSÉ GUILHERME S.; MARIA DAS GRAÇAS, B. ZOGHBI. Aroma volatile constituents of Brazilian varieties of mango fruit. **Journal of food composition and analysis**, v. 13, n. 1, p. 27-33, 2000.
- BEYAERT, I., WÄSCHKE, N., SCHOLZ, A., VARAMA, M., REINECKE, A., & HILKER, M. Relevance of resource-indicating key volatiles and habitat odour for insect orientation. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 5, p. 1077-1086, 2010.
- BIASAZIN, T. D., KARLSSON, M. F., HILLBUR, Y., SEYOUM, E., & DEKKER, T. (2014). Identification of host blends that attract the African invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 9, p. 966-976, 2014.
- BRUCE, Toby JA; WADHAMS, Lester J.; WOODCOCK, Christine M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in plant science**, v. 10, n. 6, p. 269-274, 2005.
- CARVALHO, R. D. S. (2005). Controle Biológico de Moscas-das-frutas (Tephritidae) no Brasil. Controle Biológico de Moscas-das-frutas (Tephritidae) no Brasil. **POLTRONIERI, LS, TRINDADE, DR & SANTOS, IP Pragas e Doenças de Cultivos Amazônicos. Belém, EMBAPA**, p. 375-376, 2005.
- CRUZ-LÓPEZ, L., MALO, E. A., TOLEDO, J., VIRGEN, A., DEL MAZO, A., & ROJAS, J. C. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 2, p. 351-365, 2006.
- CRUZ-LÓPEZ, LEOPOLDO; MALO, EDI A.; ROJAS, JULIO C. Sex pheromone of *Anastrepha striata*. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 5, p. 458-464, 2015.
- DIAZ-SANTIZ, E., ROJAS, J. C., CRUZ-LÓPEZ, L., HERNÁNDEZ, E., & MALO, E. A. Olfactory response of *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) to guava and sweet orange volatiles. **Insect science**, v. 23, n. 5, p. 720-727, 2016.
- FERREIRA, H. D. J., VELOSO, V. D. R. S., NAVES, R. V., & BRAGA FILHO, J. R. Infestação de moscas-das-frutas em variedades de manga (*Mangifera indica* L.) no Estado de Goiás. 2003.
- GODOY, MARIA JULIA SIGNORETTI; PACHECO, WILDA DA SILVEIRA PINTO; MALAVASI, A. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. **Silva, RA, Lemos, WP, Zucchi, RA Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais. Embrapa. Macapá, Amapá, Brasil**, p. 111, 2011.
- HEATH RR, LANDOLT PJ, ROBACKER DC, DUEBEN BD, EPSKY ND. Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. **Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior. CRC-Press, Boca Raton, FL, USA**, p. 793-809, 2000.

- KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; TREICHEL, M.; FILTER, C.F. Anuário Brasileiro de Fruticultura. Editora Gazeta: Santa Cruz do Sul, 2017.
- MALAVASI, A., MORGANTE, J. S., & ZUCCHI, R. A. MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; ZUCCHI, R. A. Biologia de “moscas-das-frutas” (Diptera: Tephritidae). I. Lista de hospedeiros e ocorrência. **Rev. Bras. Biol**, v. 40, n. 1, p. 9-16, 1980.
- MALAVASI, A., ZUCCHI, R. A., & SUGAYAMA, R. L. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000.
- MALO EA, GALLEGOS-TORRES I, TOLEDO J, VALLE-MORA J, ROJAS JC. Attraction of the West Indian fruit fly to mango fruit volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 45-52, 2012.
- MALO, E. A., CRUZ-LÓPEZ, L., TOLEDO, J., DEL MAZO, A., VIRGEN, A., & ROJAS, J. C. Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to guava volatiles. **Florida Entomologist**, p. 364-371, 2005.
- MARQUES, A.S.S. Monitoramento de moscas das frutas em pomar de laranjeira em Altamira-Pará. Tese (Doutorado em Agronomia). Adrielli do Socorro Silva Marques- Pará. Marques, A.S.S 2010.
- MELO, PRISCILLA SIQUEIRA. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- MILET-PINHEIRO, P., NAVARRO, D. M., DE AQUINO, N. C., FERREIRA, L. L., TAVARES, R. F., DA SILVA, R. D. C. C., ... & DO NASCIMENTO, R. R. Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Chemoecology**, v. 25, n. 3, p. 115-122, 2015.
- NISHIDA R, TAN KH, LAJIS NH, SUKARI AM, TAKAHASHI S, FUKAMI H. Accumulation of phenylpropanoids in the rectal glands of males of the Oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*. **Experientia**, v. 44, n. 6, p. 534-536, 1988.
- NISHIMURA, O., YAMAGUCHI, K., MIHARA, S., and SHIBAMOTO, T. Volatile constituents of guava fruits (*Psidium guajava* L.) and canned puree. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 37, n. 1, p. 139-142, 1989.
- NORRBOM, A. L., RODRIGUEZ, E. J., STECK, G. J., SUTTON, B. A., & NOLAZCO, N. New species and host plants of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) primarily from Peru and Bolivia. **Zootaxa**, v. 4041, p. 1-94, 2015
- PEREIRA, F. M., & KAVATI, R. Contribution of the Brazilian scientific research in the development of some fruit trees of subtropical climate. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 92-108, 2011.
- PINO, J.A.; QUIJANO, C.E. Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5883-5887, 2001.

- PROKOPY, R.J., HU, X.P., JANG, E.B., VARGAS, R.I. AND WARTHEN, J.D. Attraction of mature *Ceratitis capitata* females to 2-heptanone, a component of coffee fruit odor. **Journal of chemical ecology**, v. 24, n. 8, p. 1293-1304, 1998.
- QUIJANO, Clara Elizabeth; PINO, Jorge A. Characterization of volatile compounds in guava (*Psidium guajava* L.) varieties from Colombia. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, v. 38, n. 3, 2007.
- RASGADO, M. A., MALO, E. A., CRUZ-LÓPEZ, L., ROJAS, J. C., & TOLEDO, J. Olfactory response of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to *Citrus aurantium* volatiles. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 2, p. 585-594, 2009.
- RENOU, M. Pheromones and general odor perception in insects. **Neurobiology of chemical communication**, p. 23, 2014.
- ROBACKER, D. C. Effects of shape and size of colored traps on attractiveness to irradiated, laboratory-strain Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 75, n. 2, p. 230-241, 1992.
- ROBACKER, D. C., MORENO, A. T., GARCIA, J. A., & FLATH, R. A. A novel attractant for Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*, from fermented host fruit. **Journal of chemical ecology**, v. 16, n. 10, p. 2799-2815, 1990.
- SANDOVAL, I. S., HERNANDEZ, S. VALDEZ, G. V., and CRUZ-LOPEZ, L. Volatiles of mango var. Ataulfo characterized by SPME and capillary GC/MS spectroscopy. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 51, n. 3, p. 145-147, 2007.
- SELIVON, D. Biologia a padrões de especiação. pp25-38. In: Malavasi, A. Zucchi, R. A. (eds.), *Moscas- das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado*, Holos, Ribeirão Preto. 327p, 2000.
- TAMURA, H., BOONBUMLUNG, S., YOSHIZAWA, T., VARANYAN, W. 2000. Volatile components of the essential oils in the pulp of four yellow mangoes (*Mangifera indica* L.) in Thailand. **Food science and technology research**, v. 6, n. 1, p. 68-73, 2000.
- TOKUSHIMA, I., ORANKANOK, W., TAN, K. H., ONO, H., & NISHIDA, R. Accumulation of phenylpropanoid and sesquiterpenoid volatiles in male rectal pheromonal glands of the guava fruit fly, *Bactrocera correcta*. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 12, p. 1327-1334, 2010.
- TOLEDO, J., MALO, E. A., CRUZ-LÓPEZ, L., & ROJAS, J. C. Field evaluation of potential fruit-derived lures for *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 6, p. 2072-2077, 2009.
- VANIČKOVÁ L, NASCIMENTO RR, HOSKOVEC M, JEŽKOVÁ Z, BŘÍZOVÁ R, TOMČALA A, KALINOVÁ B. Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of the medfly sex pheromone. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7168-7176, 2012.

WARTHEN, J.D., LEE, C.J., JANG, E.B., LANCE, D.R. AND MCINNIS, D.O. Volatile, potential attractants from ripe coffee fruit for female Mediterranean fruit fly. **Journal of chemical ecology**, v. 23, n. 7, p. 1891-1900, 1997.

WHARTON, R. A.; YODER, M. J. Parasitoids of Fruit-Infesting Tephritidae. 2013. Disponível em: <<http://paroffit.org>>. Acesso em: 18 novembro 2018.

**5. CAPÍTULO III - Atração de fêmeas de *Anastrepha obliqua* a compostos comuns aos frutos hospedeiros e aos componentes voláteis liberados por machos homoespecíficos**

## **Atração de fêmeas de *Anastrepha obliqua* a compostos comuns aos frutos hospedeiros e aos componentes voláteis liberados por de machos homoespecíficos**

NATHALY C. DE AQUINO<sup>1</sup>; RAPHAEL DE F. TAVARES<sup>2</sup> LUANA L. FERREIRA<sup>1</sup>; ADRIANA DE L. MENDONÇA<sup>3</sup>; RUTH R. DO NASCIMENTO<sup>4</sup>

1. Doutoranda - Renorbio.
2. Doutorando em Química e Biotecnologia - PPGQB-UFAL
3. Profª Dra. - Centro Universitário Tiradentes
4. Profª Dra. Instituto de Química e Biotecnologia-UFAL

### **RESUMO**

Nos últimos anos os fruticultores enfrentam o desafio de produzir frutos de qualidade para cumprir novas exigências dos países importadores, uma vez que, o mercado internacional tem adotado protocolos de certificação para estabelecer a equivalência dos produtos através das fronteiras. Dentre as pragas quarentenárias presentes no Brasil, destaca-se a espécie *A. obliqua* que é polífaga e está distribuída em todas as regiões brasileiras devido a sua capacidade de adaptação. Com o intuito de compreender a polifagia desta praga, o presente trabalho tem como objetivo determinar formulações de misturas atraentes para fêmeas de *A. obliqua* provenientes compostos comuns aos extratos de machos coespecíficos e dos frutos hospedeiros goiaba, carambola e manga através de bioensaios comportamentais conduzidos em laboratório. Os resultados demonstraram que todas as formulações obtidas dos compostos comuns ao extrato de goiaba e manga são atraentes para as fêmeas homoespecíficas quanto os seus respectivos estrato do controle positivo e os testes com as formulações do fruto de carambola, resultaram em uma atratividade semelhante ao controle positivo para as formulações M3FC e M4FC e para as misturas M1FC e M2FC a atratividade foi maior que para o controle positivo. Estes resultados indicam que diferentes misturas podem atrair as fêmeas de *A. obliqua* mesmo que sejam provenientes de diferentes hospedeiros.

**Palavras-chave:** feromônio, cairomônios, compostos comuns

## INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira encontra-se em expansão, com um total de mais de dois milhões de hectares destinados à plantação de frutíferas de importância econômica, correspondendo a 2,6% da área total ocupada pela agricultura brasileira, cuja produção destina-se ao mercado nacional e internacional o que resultou em uma produção de cerca de 40 milhões de toneladas de frutas frescas no ano de 2016 (CARVALHO *et al.*, 2017). Apesar deste evidente crescimento, o Brasil tem sofrido com as restrições fitossanitárias impostas pelos países importadores nas relações comerciais internacionais de frutos *in natura* gerada pela conscientização dos consumidores externos em relação aos riscos da presença de agrotóxicos (GODOY *et al.*, 2011).

Dentre as pragas de restrição quarentenária encontram-se as moscas das frutas com destaque para a família Tephritidae que representa um grande obstáculo ao livre trânsito de frutas no comércio internacional devido as grandes perdas em frutíferas comerciais (PINHEIRO *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2009). Atualmente, os gêneros de moscas das frutas de maior importância econômica são *Ceratitis* e *Anastrepha*, responsáveis pela infestação da maioria das frutíferas produzidas no Brasil (ZUCCHI, 2000).

A distribuição geográfica, de uma espécie de moscas das frutas, está inteiramente relacionada com os hospedeiros que ela é capaz de utilizar como alimento, desta forma a diversidade de gêneros presentes no Brasil reflete suas interações com o hospedeiro e sua ocorrência e adaptações que resultaram das condições ambientais e da competição entre espécies (SELIVON, 2000). No gênero *Anastrepha*, as espécies mais polífagas são *A. fraterculus*, desenvolvendo-se em 115 espécies de hospedeiros com preferência por frutos da família Myrtaceae, e *A. obliqua* que se desenvolve em 49 espécies de frutos, principalmente os da família Anacardiaceae (ZUCCHI, 2012).

No caso da *A. obliqua*, estudos demonstraram que ambos os sexos são atraídos para compostos voláteis de frutos de cajá e seriguela (ORTEGA & MIRELES, 1996; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009). No estado de Alagoas, os principais hospedeiros de *A. obliqua* são os frutos de goiaba, manga e carambola e a composição química dos extratos destes frutos já é conhecida (GONÇALVES, 2001; SANTOS, 2003). Algumas formulações baseadas no uso de semioquímicos como agentes de atração para espécies de moscas das frutas encontram-se disponíveis para as espécies: *Bactrocera dorsalis* (US2011290909), *Ceratitis capitata* e *A. ludens* (US19874820513, BR8605335,

GB2178315), além de *A. obliqua* (US2008030572). Sabendo da importância dos cairomônios na atração de fêmeas de *A. obliqua*, propõe-se um estudo da atratividade de fêmeas frente aos compostos voláteis comuns entre o feromônio sexual e os voláteis dos frutos de carambola, goiaba e manga objetivando o emprego destes no monitoramento e controle desta praga.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta do material biológico e manutenção dos insetos**

Coletas de frutos de infestados e sadios foram realizadas em pomares domésticos no município de Maceió-AL (9°39' 59" S, 35° 44' 6" W). No laboratório de Ecologia Química, da Universidade Federal de Alagoas, os frutos infestados, foram armazenados em gaiolas de isopor (44 × 35 × 25 cm) a espera do período de emergência das moscas. Posteriormente, os insetos adultos, foram mantidos em gaiolas de vidro (30cm x20,5cm x 16cm), sendo alimentadas com dieta artificial rica em proteína e carboidratos (extrato de soja, açúcar, levedo de cerveja e germe de trigo na proporção 3:3:1:1), água e frutos para oviposição. Duas vezes por semana foram efetuadas a limpeza destas gaiolas e a substituição dos recipientes contendo a dieta artificial, água, e os frutos além da coleta das moscas que emergiram dos frutos infestados no campo e dos frutos retirados das gaiolas mantidas em laboratório. A temperatura da sala de criação foi mantida em 25°C, umidade relativa de 60% e fotoperíodo de 14 horas (14h luz/10h escuro).

### **Coleta dos voláteis dos frutos**

Para obtenção de extratos com os compostos voláteis do fruto de manga, goiaba e carambola foi usada a técnica de aeração. Para tanto, foram utilizados 250 gramas do fruto sadios no estágio verde e posteriormente foram colocados em um dessecador de vidro o qual foi acoplado a um fluxo de ar contínuo que purga as substâncias voláteis, emitidas pela manga, goiaba e carambola, no estágio verde, para um polímero adsorvente Tenax® (150,0 mg de diâmetro de 60-80 mesh). A bomba de ar (Resun® AC 2600), estava interligada a um fluxômetro (Supelco® 0,5 L/min) que controla a saída de ar para o dessecador. Antes do ar fluir através da câmara contendo os frutos, o ar de purga passou por um filtro de carvão ativo para retirar as impurezas. A cada período de 24 h, o trap contendo o adsorvente foi substituído por um novo e os compostos voláteis aprisionados no adsorvente foram dessorvidos com hexano bidestilado grau HPLC (2,0 mL), sendo este volume, distribuído em ampolas de vidro que foram seladas e acondicionadas em freezer para utilização nos ensaios de laboratório.

## Testes comportamentais em laboratórios

A identificação dos compostos liberados por machos de *A. obliqua* foi realizada por Silva (2017) e a identificação química do extrato de goiaba foi feita por Santos (2003) e dos extratos de carambola e manga por Gonçalves (2001). A comparação das análises dos constituintes químicos do feromônio, goiaba, carambola e manga revelaram a presença de compostos comuns entre estes extratos. Entre o extrato de feromônio e manga os compostos comuns são:  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno e mirceno, entre os extratos de feromônio e da goiaba: limoneno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila e  $\beta$ -cariofileno e entre os extratos de feromônio e carambola: ocimeno, 2-hexanona e linalol. A partir da detecção dos compostos comuns foram realizados testes comportamentais com formulações em misturas, para avaliar a atração de fêmeas. Inicialmente os compostos foram adquiridos comercialmente pela Sigma-Aldrich (grau de pureza 98,5%) e posteriormente foram preparadas as formulações contendo 0,01 g de um substrato biopolimérico e 10 $\mu$ l das misturas resultando em uma dose de 10 ng. As proporções utilizadas nas misturas foram as mesmas encontradas nos seus respectivos extratos. Na formulações das misturas com compostos no frutos de goiaba utilizou-se : limoneno,  $\alpha$ -copaeno, octanoato de etila e  $\beta$ -cariofileno na proporção de 4,2:4:1:3,8 respectivamente, para as misturas do fruto de carambola os compostos ocimeno, 2-hexanona e linalol na proporção 1:1,5: 25,3 respectivamente e para o fruto de manga com  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno e mirceno a proporção de 11,5:1:1:66,6 respectivamente.

Os testes comportamentais foram realizados em uma arena de vidro (45 cm x 30 cm x 30 cm) cobertas com tecido voil no horário entre as 14:00-17:00 h, onde as formulações foram penduradas nas extremidades da arena, de maneira equidistante (30 cm). O Controle positivo foi constituído por uma mistura dos extratos dos frutos e do feromônio e o controle negativo o eppendorf contendo o polímero adsorvente (substrato). O tempo de duração do bioensaio foi de 20 minutos, sendo realizadas 6 repetições por tratamento e utilizados 6 fêmeas diferentes para cada repetição. Os comportamentos registrados foram de pouso e permanência na fonte de odor, os quais foram caracterizados como comportamento de atração. As respectivas misturas para cada fruto foram: para o fruto de manga **M1FM**:  $\alpha$  – pineno, canfeno, sabineno, mirceno, **M2FM**:  $\alpha$  – pineno, canfeno, sabineno, **M3FM**:  $\alpha$  – pineno, sabineno, mirceno, **M4FM**: canfeno, sabineno, mirceno e **M5FM**:  $\alpha$  – pineno, canfeno, mirceno; para o fruto de goiaba; **M1FG**: limoneno, octanoato de etila,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno. **M2FG**: limoneno, octanoato de etila,  $\beta$ -cariofileno, **M3FG**: limoneno, octanoato de etila e  $\alpha$ -copaeno, **M4FG**: limoneno,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno e **M5FG**: octanoato de

etila,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno; para o fruto de carambola **M1FC**: ocimeno, 2- hexanona, linalol, **M2FC**: ocimeno e 2- hexanona, **M3FC**: 2- hexanona, linalol e **M4FC**: ocimeno e linalol, conforme consta na tabela 1. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições com o objetivo de avaliar a atratividade simultânea das fêmeas acasaladas para dois tratamentos diferentes.

**Tabela 1-** Formulações de compostos comuns aos extratos de manga e dos frutos de goiaba, carambola e manga

<b>Goiaba</b>
<b>M1FG</b> : limoneno, octanoato de etila, $\beta$ -cariofileno e $\alpha$ -copaeno
<b>M2FM</b> : $\alpha$ – pineno, canfeno, sabineno
<b>M3FM</b> : $\alpha$ – pineno, sabineno, mirceno
<b>M4FG</b> : limoneno, $\beta$ -cariofileno e $\alpha$ -copaeno
<b>M5FG</b> : octanoato de etila, $\beta$ -cariofileno e $\alpha$ -copaeno
<b>M1FG</b> : limoneno, octanoato de etila, $\beta$ -cariofileno e $\alpha$ -copaeno
<b>Carambola</b>
<b>M1FC</b> : ocimeno, 2- hexanona, linalol
<b>M2FC</b> : ocimeno e 2- hexanona
<b>M3FC</b> : 2- hexanona, linalol
<b>M4FC</b> : ocimeno e linalol
<b>Manga</b>
<b>M1FM</b> : $\alpha$ – pineno, canfeno, sabineno, mirceno
<b>M2FM</b> : $\alpha$ – pineno, canfeno, sabineno
<b>M3FM</b> : $\alpha$ – pineno, sabineno, mirceno
<b>M4FM</b> : canfeno, sabineno, mirceno
<b>M5FM</b> : $\alpha$ – pineno, canfeno, mirceno

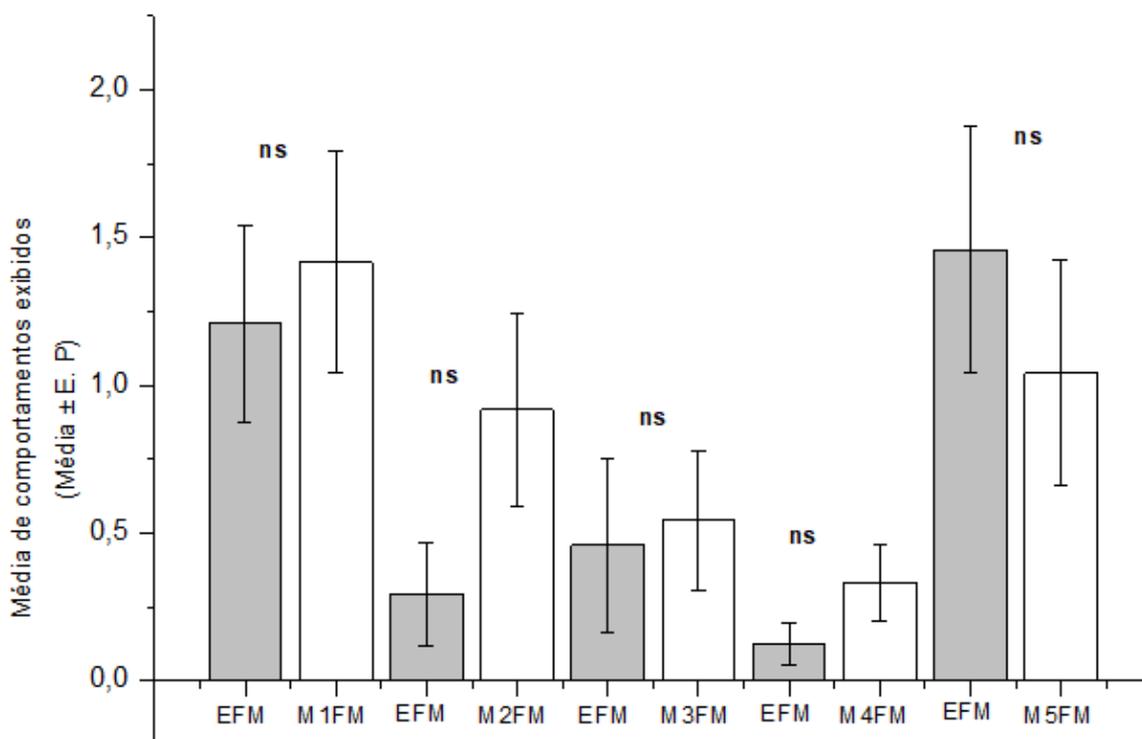
### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Assistat 7.7. Inicialmente foram aplicados os testes de Lilliefors e Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.05$ ) com o objetivo de avaliar os pressupostos paramétricos de normalidade e homogeneidade das variâncias dos resíduos. Os resultados atenderam os parâmetros de normalidade e homogeneidade, possibilitando a aplicação teste de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ) para verificação de diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em uma mesma repetição.

## RESULTADOS

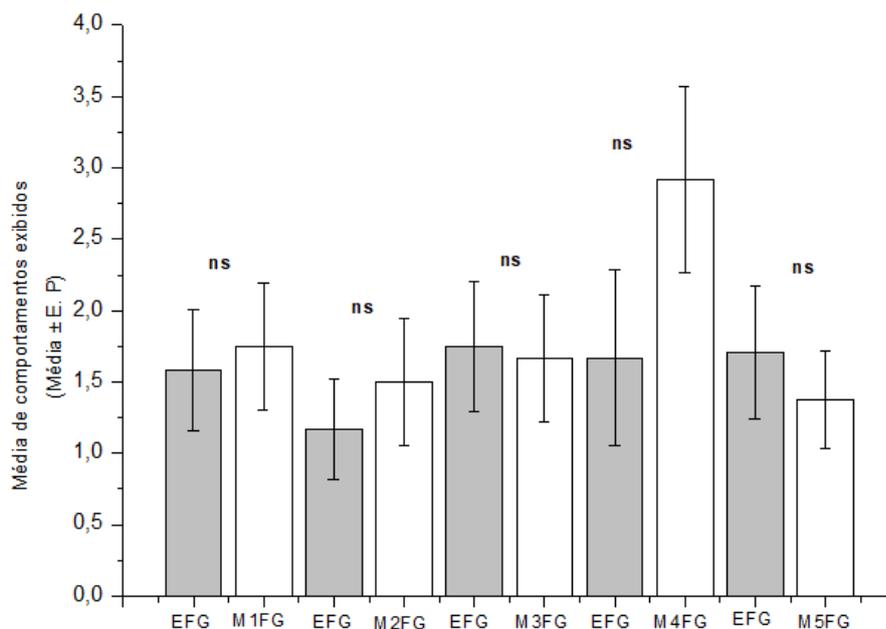
Os resultados obtidos com os bioensaios comportamentais demonstraram que todas as formulações dos compostos do extrato de manga (Figura 1) e extrato de goiaba (Figura 2) são tão atraentes quando os respectivos extratos positivos ( $Z_{M1FM}= 1,058$ ,  $Z_{M2FM}= 1,586$ ,  $Z_{M3FM}=0,493$ ,  $Z_{M4FM}= 1,248$  e  $Z_{M5FM}= 0,821$ ) ( $Z_{M1FG}= 0,350$ ,  $Z_{M2FG}= 0,309$ ,  $Z_{M3FG}= 0,350$ ,  $Z_{M4FG}= 1,488$  e  $Z_{M5FG}= 0,496$ ). Os testes com as formulações do fruto de carambola, resultaram em uma atratividade semelhante ao controle positivo para as formulações M3FC e M4FC ( $Z_{M3FC}= 0$ ,  $Z_{M4FC}= 0,409$ ) e para as misturas M1FC e M2FC ( $Z_{M1FC}= 2,125$ ,  $Z_{M2FC}= 2,468$ ) a atratividade foi maior que para o controle positivo (Figura 3).

**Figura 1** – Atratividade para formulações do fruto de manga



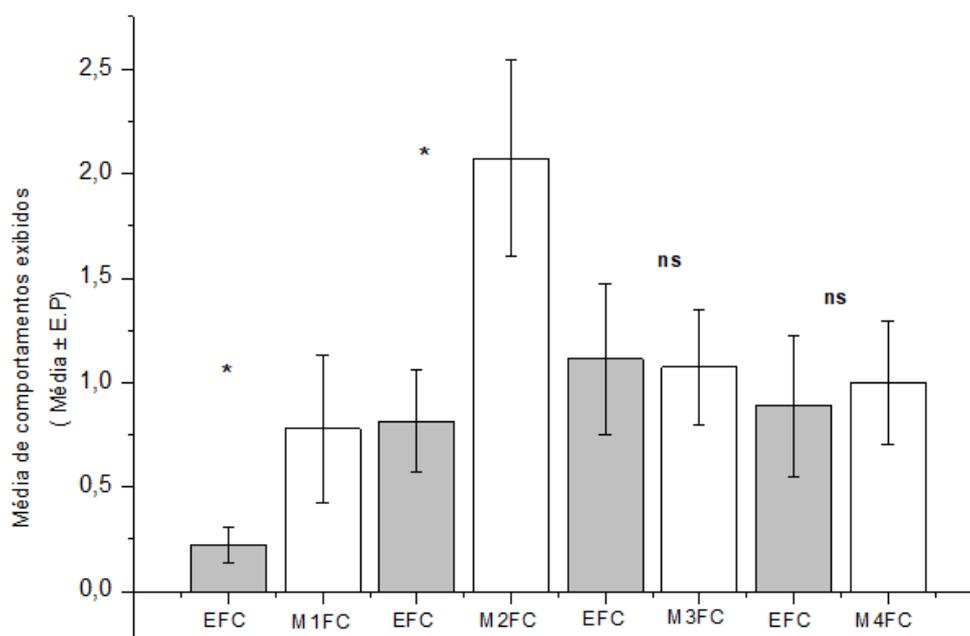
**Nota:** EF- extrato de fruto de manga, **M1FM:**  $\alpha$  – pineno, canfeno, sabineno, mirceno, **M2FM:**  $\alpha$  – pineno, canfeno, sabineno, **M3FM:**  $\alpha$  – pineno, sabineno, mirceno, **M4FM:** canfeno, sabineno, mirceno e **M5FM:**  $\alpha$  – pineno, canfeno, mirceno; para o fruto de goiaba. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p<0.05$ ).

**Figura 2** – Atratividade para misturas formuladas com compostos do fruto de goiaba



**Nota:** EF- extrato de fruto de goiaba, **M1FG:** limoneno, octanoato de etila,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno. **M2FG:** limoneno, octanoato de etila,  $\beta$ -cariofileno, **M3FG:** limoneno, octanoato de etila e  $\alpha$ -copaeno, **M4FG:** limoneno,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno e **M5FG:** octanoato de etila,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -copaeno. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ).

**Figura 3** – Atratividade para formulações com compostos do fruto de carambola



**Nota:** EF- extrato de fruto de carambola, **M1FC:** ocimeno, 2- hexanona, linalol, **M2FC:** ocimeno e 2- hexanona, **M3FC:** 2- hexanona, linalol e **M4FC:** ocimeno e linalol. ns – indica ausência de diferença estatística significativa pelo teste *t* de Student ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSÃO

Os compostos comuns entre o feromônio e os extratos dos frutos de goiaba, carambola e manga utilizados neste trabalho, foram reportados como ativos para as fêmeas de *A. obliqua* conforme descrito no capítulo II. Dentre os compostos comuns entre goiaba e o extrato de feromônio, apenas o composto  $\beta$ -cariofileno foi EAD ativo no seu respectivo extrato do fruto, para o extrato de carambola os componentes linalol e ocimeno foram comuns aos EAD ativos no extrato de carambola e no extrato de manga todos os compostos comuns foram exatamente os mesmo componentes EAD ativos no extrato de manga. Inicialmente esperava-se que todos os compostos comuns fossem EAD ativos nos seus respectivos extratos, uma vez que apresentavam um ação feromonal e cairomonal, mas esta hipótese só foi confirmada para os compostos do fruto de manga. No que se refere a baixa similaridade entre os compostos comuns e os EAD ativos nos extratos de goiaba e carambola, pode-se propor o que foi sugerido por Renou *et al.* 2014, os quais sugeriram que o reconhecimento dos componentes de um hospedeiro, estão diretamente ligados a três fatores, dentre eles a onipresença dos componentes e a variabilidade da composição, desta forma, sugere-se que a variação na proporção química dos extratos destes frutos podem ter interferido na resposta eletrofisiológica das fêmeas.

Os compostos comuns entre o feromônio e os extratos dos frutos foram reportados como pertencentes ao feromônio sexual de diferentes espécies de moscas das frutas (BŘÍZOVÁ *et al.*, 2013; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2015; MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015; DIAZ-SANTIZ *et al.*, 2016). No que se refere a espécie *A. fraterculus*, foi detectada a presença do composto limoneno no feromônio sexual nas populações do Peru, Argentina e Brasil (CÁCERES *et al.*, 2009; BŘÍZOVÁ *et al.*, 2013 MILET-PINHEIRO *et al.*, 2015). O componente limoneno também foi identificado no feromônio da espécie *A. ludens* além dos compostos octanoato de etila, linalol, mirceno e limoneno em *A. striata* (ROCCA *et al.*, 1992; CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 2015).

Na espécie de *C. capitata* os componentes: linalol, mirceno, (*E*)-3-octenoato de etila, (*E*)- $\beta$ -ocimeno eliciaram atividade comportamental ou eletrofisiológica em machos e/ou fêmeas coespecíficos em bioensaios conduzidos em laboratório ou em campo (JACOBSON *et al.*, 1973, OHINATA *et al.*, 1977; BAKER *et al.*, 1985, JANG *et al.*, 1989, BAKER *et al.* 1990, COSSÉ *et al.* 1995). Na espécie *A. obliqua* os resultados dos testes eletrofisiológicos empregando extratos dos machos e antenas de fêmeas virgens de *A. obliqua* revelaram a

despolarização das antenas para os compostos: 1-heptanol, linalol, (*Z*)-3-nonen-1-ol, (*E,Z*)-3,6-nonadien-1-ol e  $\alpha$ -farneseno, conforme reportado no Capítulo I desta tese. Em seguida, em ensaios de laboratório, observou-se que esses compostos bem como suas respectivas misturas desencadearam atração em fêmeas virgens coespecíficas, dentre estes compostos encontra-se o componente linalol que além de ser EAD ativo no extrato de feromônio dos machos também foi EAD ativo no extrato do fruto de carambola (DO NASCIMENTO *et al.* 2018).

Os componentes identificados neste trabalho, também foram reportados como atraentes e responsáveis pelo o aumento da performance sexual de alguma espécies de moscas da frutas. Um estudo realizado por Vera *et al.* (2013) avaliou o efeito da exposição de machos de *A. fraterculus* à polpa da goiaba, limão e manga, constatando que o desempenho sexual dos machos aumentou quando os mesmos foram expostos aos frutos de goiaba e limão em comparação aos machos não expostos, sugerindo que o  $\alpha$ -copaeno, composto presente em maior quantidade nestes frutos, seria o composto responsável por este efeito, apesar da possibilidade do envolvimento de outros compostos, visto que o fruto libera uma mistura complexa de compostos voláteis. Bachmann *et al.* (2015), através de ensaios em laboratório, investigaram o desempenho sexual de machos selvagens e domesticados de *A. fraterculus*, expostos aos voláteis de goiaba e a uma mistura sintética de compostos liberados por este fruto ( $\alpha$ -copaeno, *trans*-cariofileno, limoneno e octanoato de etila). Os machos selvagens e domesticados, expostos aos voláteis de goiaba, exibiram um número maior de comportamento de chamamento e de liberação de feromônio quando comparados aos machos não expostos, o que resultou no aumento do número de acasalamentos registrados. De maneira análoga, a exposição à mistura sintética também resultou no aumento do sucesso de acasalamento dos machos, comprovando sua eficiência. Shelly *et al.* (2008), também investigaram o sucesso no acasalamento de machos quando estes foram expostos ao óleo essencial de manuka e ao extrato de manga, os quais apresentam em sua constituição o componente  $\alpha$ -copaeno, caracterizado em inúmeros trabalhos como agente potencializador do sistema de acasalamento de *C. capitata*.

No que se refere a atratividade de fêmeas aos componentes testados neste trabalho, um estudo foi realizado com a espécie *A. obliqua*, e as seguintes variedades de manga: Ataulfo, Coche e Amate em testes realizados em laboratório e no campo. Nos testes de campo, observou-se uma captura maior para as armadilhas contendo os extratos da variedade Amate (MALO *et al.* 2012). A partir desse resultado, foi realizada a identificação dos

compostos voláteis presentes nesta variedade, identificando-se os compostos mirceno,  $\alpha$ -pineno e *trans*- $\beta$ -ocimeno como majoritários. Posteriormente, a mistura destes compostos foi testada em gaiolas de campo resultando em menor atratividade de fêmeas quando preparada na proporção de 1:1:1, entretanto quando a mesma mistura foi testada na proporção em que é liberada pelo fruto, a mistura foi tão atraente quanto o extrato do fruto (MALO *et al.* 2012).

Os estudos que comprovam a presença dos componentes comuns destes trabalho no feromônio de diferentes espécies, a atratividade destes compostos e o aumento da performance sexual dos insetos expostos a estes componentes sugerem que possam existir componentes chaves que podem ter ação cairomonal ou feromonal. Além disso, os resultados destes trabalhos mostram que as fêmeas podem ser atraídas a diferentes formulações de misturas mesmo que todos os compostos da mistura não sejam EAD ativos nos seus respectivos extratos como foi observado para as formulações das misturas de goiaba e carambola com exceção para as misturas formuladas de manga que apresentaram todos os compostos das misturas como EAD ativos nos extratos de manga. Estes resultados indicam que as fêmeas de *A. obliqua* reconhecem e são atraídas para diferentes combinações de misturas, o que pode explicar a sua polifagia e estas misturas normalmente apresentam compostos que são comuns ao feromônio sexual liberado pelos machos e os frutos hospedeiros. Estudos complementares devem ser conduzidos para elucidar os mecanismos envolvidos no reconhecimento de fêmeas desta espécie para diferentes misturas.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. L., CUNHA, A. A., SILVA, R. K. B., NUNES, A. M. M., & GUIMARÃES, J. A. Espécies de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) na região do Baixo Jaguaribe, Estado do Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 577-581, 2009.
- BACHMANN GE, SEGURA DF, DEVESCOVI F, JUÁREZ ML, RUIZ MJ, VERA MT, CLADERA JL, TEAL PEA, FERNÁNDEZ PC. Male sexual behavior and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124250, 2015.
- BAKER PS, HOWSE PE, ONDARZA, RN, REYES J. Field trials of synthetic sex pheromone components of the male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in southern Mexico. **Journal of economic entomology**, v. 83, n. 6, p. 2235-2245, 1990.
- BAKER R, HERBERT RH, GRANT GG. Isolation and identification of the sex pheromone of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied). **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 12, p. 824-825, 1985.
- BŘÍZOVÁ R, MENDONÇA AL, VANÍCKOVÁ L, LIMA-MENDONÇA A, DA SILVA, CE, TOMČALA A, PARANHOS BAJ, DIAS VS, JOACHIM-BRAVO IS, HOSKOVEC M, KALINOVÁ B, DO NASCIMENTO RR. Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 3, p. 1107-1116, 2013.
- CACERES C, SEGURA DF, VERA MT, WORNOPYORN V, CLADERA JL, TEAL P, SAPOUNTZIS P, BOURTZIS K, ZACHAROPOULOU A, ROBINSON AS. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 97, n. 1, p. 152-165, 2009.
- CARVALHO, C. D., KIST, B. B., SANTOS, C. D., TREICHEL, M., & FILTER, C. F. Anuário brasileiro da fruticultura 2017. **Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz**, 2017.
- COSSE AA, TODD JL, MILLAR J G, MARTINEZ LA, BAKER TC. Electroantennographic and coupled gas chromatographic-electroantennographic responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to male-produced volatiles and mango odor. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 11, p. 1823-1836, 1995
- CRUZ-LÓPEZ L, MALO EA, ROJAS JC. Sex pheromone of *Anastrepha striata*. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 5, p. 458-464, 2015.
- CRUZ-LÓPEZ, L., MALO, E. A., TOLEDO, J., VIRGEN, A., DEL MAZO, A., & ROJAS, J. C. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 2, p. 351-365, 2006.
- DÍAZ-SANTIZ E, ROJAS JC, CRUZ-LÓPEZ L, HERNÁNDEZ E, MALO EA. Olfactory response of *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) to guava and sweet orange volatiles. **Insect science**, v. 23, n. 5, p. 720-727, 2016.

DO NASCIMENTO RR, TAVARES RF, AQUINO NC, FERREIRA LL, MENDONÇA AL, SILVA CS, ABREU FC, MILET-PINHEIRO P, NAVARRO DMA (2018) BR patente 10 2018 000016 0.

GODOY, M. J. S., PACHECO, W. D. S. P., & MALAVASI, A. Moscas-das-frutas quarentenárias para o Brasil. **Silva, RA, Lemos, WP, Zucchi, RA Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais. Embrapa. Macapá, Amapá, Brasil**, p. 111, 2011.

GONÇALVES GB, SILVA CE, DE LIMA MENDONÇA A, VANÍČKOVÁ L, TOMČALA A, NASCIMENTO RRD. Pheromone communication in *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae): A comparison of the volatiles and salivary gland extracts of two wild populations. **Florida Entomologist**, p. 1365-1374, 2013.

GONÇALVEZ, G.B. Influência dos constituintes voláteis dos hospedeiros *Averrhoa carambola* L. e *Mangifera indica* L. na composição química das substâncias liberadas por machos de *Anastrepha obliqua* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil. 70p, 2001.

GONZÁLEZ R, TOLEDO J, CRUZ-LOPEZ L, VIRGEN A, SANTIESTEBAN A, MALO EA. A new blend of white sapote fruit volatiles as potential attractant to *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 99, n. 6, p. 1994-2001, 2006.

HEATH RR, LANDOLT PJ, ROBACKER DC, DUEBEN BD, EPSKY ND. Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. **Fruit flies (Tephritidae) phylogeny and evolution of behavior. CRC-Press, Boca Raton, FL, USA**, p. 793-809, 2000.

JACOBSON M, OHINATA K, CHAMBERS DL, JONES WA, FUJIMOTO MS. Isolation, identification, and synthesis of sex pheromones of the male Mediterranean fruit fly. **Journal of medicinal chemistry**, v. 16, n. 3, p. 248-251, 1973

JANG EB, LIGHT DM, FLATH RA, NAGATA JT, MON TR. Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* to identified volatile constituents from calling males. **Entomologia experimentalis et Applicata**, v. 50, n. 1, p. 7-19, 1989.

MALO EA, GALLEGOS-TORRES I, TOLEDO J, VALLE-MORA J, ROJAS JC. Attraction of the West Indian fruit fly to mango fruit volatiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, n. 1, p. 45-52, 2012.

MILET-PINHEIRO P, NAVARRO DM, DE AQUINO NC, FERREIRA LL, TAVARES RF, DA SILVA RCC, LIMA-MENDONÇA A, VANÍČKOVÁ L, MENDONÇA AL, DO NASCIMENTO RR. Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Chemoecology**, v. 25, n. 3, p. 115-122, 2015.

OHINATA K, JACOBSON M, NAKAGAWA S, FUJIMOTO MS, HIGA H. Laboratory and field evaluations of synthetic sex pheromones. **Journal of Environmental Science & Health Part A**, v. 12, n. 3, p. 67-78, 1977.

PINHEIRO, F. A., DE BARROS, A. V., & PINHEIRO, S. Processos de certificação para exportação de frutas frescas brasileiras. In: **XXIX Encontro nacional de engenharia de produção**. Bahia, 2009.

RENOU, Michel. Pheromones and general odor perception in insects. **Neurobiology of chemical communication**, p. 23, 2014.

ROCCA JR, NATION JL, STREKOWSKI L, BATTISTE MA. Comparison of volatiles emitted by male Caribbean and Mexican fruit flies. **Journal of chemical ecology**, v. 18, n. 2, p. 223-244, 1992.

SANTOS JCG. Estudo comparativo dos constituintes voláteis liberados por machos de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) e o seu fruto hospedeiro, *Psidium guajava*. Tese, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Maceió/AL, Brazil, 78p, 2003.

SELIVON, D. Biologia a padrões de especiação. pp25-38. In: Malavasi, A. Zucchi, R. A. (eds.), Moscas- das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado, Holos, Ribeirão Preto. 327p, 2000.

SHELLY TE, COWAN NA, EDU J, PAHIO E. Mating success of male Mediterranean fruit flies following exposure to two sources of  $\alpha$ -copaene, manuka oil and mango. **Florida Entomologist**, v. 91, n. 1, p. 9-16, 2008.

TOLEDO, J., MALO, E. A., CRUZ-LÓPEZ, L., & ROJAS, J. C. Field evaluation of potential fruit-derived lures for *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 6, p. 2072-2077, 2009.

VERA MT, RUIZ MJ, OVIEDO A, ABRAHAM S, MENDOZA M, SEGURA DF, KOULOSSIS E, WILLINK E. Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 2-10, 2013.

ZALETA, D. A. O., & MÍRELES, H. C. (1996). Productos naturales y comerciales para la captura de *Anastrepha obliqua* M. EN TRAMPAS McPHAIL EN VERACRUZ. **Agricultura técnica en Mexico**, v. 22, p. 63, 1996

ZUCCHI, R. A. Taxonomia In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Org.) Moscas das frutas de Importância Econômica no Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

ZUCCHI, R.A. 2012. Fruit flies in Brazil - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly. Available in: [www.lea.esalq.usp.br/ceratitidis/](http://www.lea.esalq.usp.br/ceratitidis/), updated on January 18. Acessado em 23 de janeiro de 2018.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral desta tese foi identificar formulações atraentes para fêmeas de *Anastrepha obliqua* provenientes dos compostos voláteis presentes no feromônio liberado por machos e aqueles emitidos por goiaba, carambola e manga. Dentro desta proposta, foram identificados compostos ativos nos extratos do feromônio e dos frutos que foram testados a partir de formulações de misturas em bioensaios de dupla escolha. Além disso, observou-se uma similaridade entre os compostos presentes nos extratos do feromônio e dos frutos, o que permitiu a condução de testes comportamentais com misturas formuladas a partir destes compostos. A amplitude desta pesquisa pode ser avaliada considerando que se testou a atratividade de compostos voláteis derivados de machos coespecíficos e de frutos hospedeiros na comunicação química entre indivíduos da mesma espécie (ação feromonal) e entre indivíduos de espécies diferentes (ação cairomonal). A partir deste tipo de estudo é possível considerar que estes insetos, podem perceber mudanças na concentração dos compostos, na composição de misturas e na isomeria, conferindo a antena uma excelente especificidade e sensibilidade. Diante do exposto, faz-se necessário a identificação eletrofisiológica de compostos em outros hospedeiros de *A. obliqua* para esclarecer como ocorre o reconhecimento de diferentes frutos. A partir da elucidação deste questionamento somado aos testes em condições seminaturais e os resultados apresentados nesta tese, as formulações propostas poderão constituir potenciais produtos para o controle da praga *A. obliqua*.

## 7. APÊNDICE

Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados do Capítulo I



02/01/2018 870180000063  
12:23  
  
29409161711926824

### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 000016 0

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24464109000148

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57072-970

**País:** Brasil

**Telefone:** 82-3214-1064

**Fax:** 82-3214-1035

**Email:** nit@propep.ufal.br

Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados do Capítulo II  
Identificação dos compostos bioativos do extrato de goiaba



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2018 072563 7

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24464109000148

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57072-970

**País:** Brasil

**Telefone:** 82-3214-1064

**Fax:** 82-3214-1035

**Email:** nit@propep.ufal.br

**Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados da identificação dos compostos bioativos do extrato de manga**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo:** BR 10 2018 071320 5

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 1**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24464109000148

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57072-970

**País:** Brasil

**Telefone:** 82-3214-1064

**Fax:** 82-3214-1035

**Email:** nit@propep.ufal.br

**Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados da identificação dos compostos bioativos do extrato de carambola**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo: BR 10 2019 004541 8**

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24464109000148

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

**Cidade:** Maceió

**Estado:** AL

**CEP:** 57072-970

**País:** Brasil

**Telefone:** 82-3214-1064

**Fax:** 82-3214-1035

**Email:** nit@propep.ufal.br

## Comprovante de submissão de patente referentes aos resultados do Capítulo III



### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 004543 4

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br